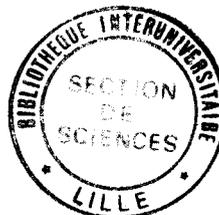


50 376  
1991  
222

66 358



50376  
1991  
222

**THESE**

N° d'ordre 798

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LA FLANDRES ARTOIS**

pour l'obtention du grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

**EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Spécialité : BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE**

par



**MURIEL CHAMOUX**

**ETUDE DES PROPRIETES  
BIOLOGIQUES DE L'ANGIOGENINE  
BOVINE ET MISE EN EVIDENCE  
D'UN RECEPTEUR SUR LES  
CELLULES ENDOTHELIALES  
DE CAPILLAIRES**

Présentée le 5 novembre 1991 devant la commission d'examen

<b>Président</b>	:	<b>J. Montreuil</b>
<b>Rapporteur</b>	:	<b>L. Drouet</b>
<b>Rapporteur</b>	:	<b>A. Verbert</b>
<b>Examineur</b>	:	<b>A. Tartar</b>
<b>Examineur</b>	:	<b>R. Cecchelli</b>
<b>Examineur</b>	:	<b>G. Spik</b>

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Chimie Biologique (Directeur : Professeur A. Verbert) de l'Université des Sciences et Techniques de Lille I (Unité Mixte de Recherche du C.N.R.S. n°111 : Relation structure-fonction des constituants membranaires), sous la direction de Madame le Professeur G. Spik et sous contrat cofinancé par le C.N.R.S. et la Région Nord-Pas de Calais.

**A Madame le Professeur G. Spik,**

Je vous remercie d'avoir guidé mes premiers pas dans la Recherche et de m'avoir fait découvrir les joies qu'elle procure. Je veux aujourd'hui vous en remercier très sincèrement.

**A Monsieur le Professeur J. Montreuil,**

Je trouve ici l'occasion de vous remercier très vivement pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant dans votre laboratoire. Je suis reconnaissante de l'honneur que vous me faites de présider aujourd'hui cette thèse. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

**A Monsieur le Professeur A. Verbert,**

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour vos encouragements et votre bonne humeur permanente. Vous avez bien voulu me faire l'honneur d'être rapporteur de cette thèse, je vous en remercie vivement.

**A Monsieur le Professeur L. Drouet,**

Vous avez accepté de me faire profiter de votre haute compétence scientifique en jugeant ce travail. Je suis très honorée de votre présence parmi les membres du Jury en tant que rapporteur et vous en remercie vivement.

**A Monsieur le Professeur A. Tartar,**

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre collaboration sur la purification des protéines. Vous avez bien voulu me faire l'honneur de juger cette thèse, soyez remercié et assuré de ma profonde reconnaissance.

**A Roméo et Marie-Pierre,**

Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Je tiens à vous remercier pour vos conseils avisés et les discussions fructueuses que vous avez su animer pour mener à bien ce travail. J'ai toujours trouvé auprès de vous beaucoup de gentillesse, de disponibilité et de compréhension ainsi que de précieux conseils. Soyez, tous les deux, assurés de ma profonde reconnaissance et de mon amitié.

Je remercie vivement Odette Labiau, Pierrette Maes, Bernadette Coddeville et Jean-Pierre Decottignies pour leur aide respective (Cellules, structure, sucre et lapins).

Je ne saurais terminer sans remercier Fabrice, Rocio, Bernadette et Papy, pour leur aide et leur soutien lors de la soutenance de cette thèse et de l'après-thèse.

Je remercie également tous ceux qui, de près ou de loin, par leurs conseils et leur amitié ont contribué à ce travail.

## ABBREVIATIONS

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique de transfert
<b>BAAE</b>	Bovine aortic arch endothelial cells
<b>BBCE</b>	Bovine brain capillary endothelial cells
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CAM</b>	Chick chorioallantoic membrane
<b>CS</b>	Calf serum
<b>CCL39</b>	Fibroblastes de poumon de Hamster chinois
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>FCS</b>	Foetal calf serum
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FPLC</b>	Fast protein liquid chromatography
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography
<b>MEM</b>	Modified Eagle medium
<b>PBS</b>	Phosphate buffer salts
<b>PD-ECGF</b>	Platelet derived-endothelial cell growth factor
<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>PHi</b>	Point isoélectrique
<b>PRI</b>	Placenta ribonuclease inhibitor
<b>RNase</b>	Ribonucléase
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>TAF</b>	Tumor angiogenesis factor
<b>TGF</b>	Transforming growth factor
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### GENERALITES

#### **I - L'ANGIOGENESE**

A - DEFINITION DE L'ANGIOGENESE	4
B - L'ANGIOGENESE TUMORALE	5
C - COMMUNICATION INTERCELLULAIRE AU COURS DE L'ANGIOGENESE	6
D - LES CELLULES ENDOTHELIALES VASCULAIRES	9
E - LES ETAPES DE LA CROISSANCE D'UN CAPILLAIRE	11
F - LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE L'ANGIOGENESE	
1 - Les modèles <u>in vivo</u>	16
2 - Les modèles <u>in vitro</u>	
3 - Conclusion	
G - CONCLUSION	20

#### **II - LES FACTEURS ANGIOGENIQUES**

A - LES DIFFERENTES CLASSES DE FACTEURS ANGIOGENIQUES	20
1 - Les facteurs de croissance angiogéniques	
2 - Les facteurs angiogéniques non mitogènes pour les cellules endothéliales	
3 - Les facteurs de croissance spécifiques des cellules endothéliales	
4 - Les autres facteurs angiogéniques	
5 - Conclusion	
B - REGULATION PHYSIOLOGIQUE DES FACTEURS ANGIOGENIQUES	32
1 - Les mécanismes d'action des facteurs angiogéniques	
2 - Le contrôle de l'activité des facteurs angiogéniques	

3 - Les inhibiteurs angiogéniques	
C - LES RECEPTEURS DES FACTEURS ANGIOGENIQUES	39
1 - Le récepteur des facteurs de croissance fibroblastiques	
2 - Le récepteur du facteur de croissance transformant $\alpha$	
3 - Le récepteur du facteur de croissance transformant $\beta$	
D - CONCLUSION	42

### **III - STRUCTURE ET PROPRIETES D'UN FACTEUR ANGIOGENIQUE:**

#### **L'ANGIOGENINE**

A - ORIGINE DE L'ANGIOGENINE	43
1 - Isolement et purification	
2 - Localisation	
B - PROPRIETES STRUCTURALES DE L'ANGIOGENINE	46
1 - Structure primaire	
2 - Structure tridimensionnelle	
C - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'ANGIOGENINE	56
1 - Activité angiogénique de l'angiogénine	
2 - Activité ribonucléasique de l'angiogénine	
3 - Inhibition des activités ribonucléasique et angiogénique	
4 - Inhibition de la synthèse protéique	
5 - Activité de l'angiogénine humaine vis-à-vis des cellules en culture	
D - RELATION STRUCTURE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'ANGIOGENINE	66
E - CONCLUSION	75

## MATERIELS ET METHODES

### I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE

#### DU LAIT DE VACHE

- A - MATERIELS 78
- B - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES 78
  - 1 - Chromatographie de "Batch-adsorption"
  - 2 - Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast Flow
  - 3 - Chromatographie sur colonne Mono-S en système FPLC
  - 4 - Chromatographie de phase réverse en système HPLC
- C - TECHNIQUES ANALYTIQUES 80
  - 1 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide
  - 2 - Dosage de protéines
  - 3 - Détermination des séquences N-terminales
  - 4 - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 201
- D - TECHNIQUES IMMUNOCHIMIQUES 83
  - 1 - Préparation des antisera dirigés contre l'angiogénine
  - 2 - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose
  - 3 - Immunorévélation

### II - ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE ISOLEE

#### DU LAIT DE VACHE

- A - MATERIELS 85
  - 1 - Nature des échantillons
  - 2 - Préparation des échantillons
- B - EVALUATION VISUELLE DE L'ANGIOGENESE DANS LA CAM 87
- C - EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ANGIOGENESE DANS LA CAM 87

### **III - ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

<b>A - MATERIELS</b>	<b>89</b>
1 - Nature et préparation des facteurs de croissance	
2 - Culture des cellules endothéliales	
3 - Culture des fibroblastes	
<b>B - MESURE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE</b>	<b>91</b>
1 - Principe	
2 - Protocole expérimental	
<b>C - MESURE DE LA SYNTHÈSE D'ADN</b>	<b>92</b>
1 - Principe	
2 - Technique appliquée aux fibroblastes	
3 - Technique appliquée aux cellules endothéliales	

### **IV - CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES**

<b>A - MATERIELS</b>	<b>94</b>
1 - Protéines	
2 - Cellules	
<b>B - RADIOMARQUAGE DES PROTEINES</b>	<b>95</b>
<b>C - REALISATION DES DOSAGES RADIORECEPTEURS</b>	<b>96</b>
1 - Cinétique de fixation	
2 - Dosage par saturation	
3 - Analyse de la fixation de l'angiogénine en présence de cuivre et du PRI	
<b>D - SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES</b>	<b>97</b>
<b>E - ELECTROPHORESE ET ELECTROTRANSFERT DES PROTEINES     MEMBRANAIRES SOLUBILISEES</b>	<b>97</b>

## RESULTATS

<b>I - <u>ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE</u></b>	
<b>A - PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE DE CATIONS</b>	100
1 - Chromatographie de "Batch-adsorption" des protéines basiques du lait de Vache	
2 - Chromatographie sur échangeur de cations S-Sépharose	
3 - Chromatographie d'échange de cations en système FPLC	
<b>B - ANALYSE ET PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE EN SYSTEME HPLC</b>	106
1 - Chromatographie de phase réverse de la Fraction 1	
2 - Chromatographie de phase réverse de l'angiogénine	
<b>C - CONCLUSION</b>	116
<b>II - <u>ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE ISOLEE DU LAIT DE VACHE</u></b>	
<b>A - PRINCIPE DE LA MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ANGIOGENIQUE IN VIVO</b>	120
<b>B - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE BOVINE</b>	120
<b>C - MESURE DE LA STIMULATION ANGIOGENIQUE INDUITE PAR L'ANGIOGENINE BOVINE</b>	121
<b>D - ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE</b>	124
1 - Comparaison : angiogénine et ribonucléase du lait de Vache	
2 - Comparaison : angiogénines bovine et humaine recombinante	
<b>E - CONCLUSION</b>	125

### **III - ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

A - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE	131
B - INHIBITION DE L'ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE	135
C - ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE	136
1 - Etude comparative avec le facteur de croissance fibroblastique	
2 - Etude comparative avec l'angiogénine humaine recombinante	
D - CONCLUSION	143

### **IV - CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES**

A - MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES BBCE	146
1 - Cinétique de fixation de [ <sup>125</sup> I]-angiogénine	
2 - Etude de la fixation de [ <sup>125</sup> I]-angiogénine sur les BBCE	
B - PARAMETRES INFLUENCANT LA FIXATION DE L'ANGIOGENINE SUR LES BBCE	150
1 - Influence de la densité cellulaire	
2 - Inhibition de la fixation par le PRI	
3 - Effet du cuivre sur la fixation de l'angiogénine	
C - VISUALISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES BBCE	155
D - CONCLUSION	157

**CONCLUSION**

**BIBLIOGRAPHIE**

# INTRODUCTION

Nos travaux sur l'angiogénine isolée du lait de Vache, font partis du programme de recherche sur les facteurs de croissance du lait de Femme et de Vache, réalisés au Laboratoire du Professeur G. Spik. Ces études font suite aux travaux commencés par le Professeur J. Montreuil sur l'isolement des protéines et des oligosaccharides du lait de Femme. Ils ont pour but de mieux définir les effets physiologiques des protéines du lait.

Au Laboratoire, les travaux de D. Damart, ont permis de décrire, au cours de l'isolement de la lactotransferrine du lait de Vache, une nouvelle protéine dont la nature a pu être déterminée grâce à une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille, il s'agit de l'angiogénine (Damart, 1988; (Maes et al., 1988). L'angiogénine est un facteur qui induit le processus de génération de nouveaux vaisseaux sanguins appelé angiogenèse. Ce facteur a été isolé pour la première fois à partir de surnageant de culture de cellules cancéreuses (Fett et al., 1985).

L'intérêt suscité par l'angiogénine est considérable, autant du point de vue structural que biologique. Du point de vue structural, il existe des relations avec les ribonucléases, le site actif est conservé, mais les angiogénines, en plus de leur activité ribonucléasique possèdent une activité angiogénique. Il existe donc un problème relation structure-fonction intéressant à résoudre. Plusieurs techniques peuvent être utilisées comme la mutagenèse dirigée d'une part, et d'autre part, des techniques biophysiques telles que la diffraction des rayons X et la résonance magnétique nucléaire. Ces techniques nécessitent une protéine très pure en quantité importante. Nous avons donc été amené, dans un premier temps, à mettre au point une technique de préparation de

l'angiogénine à partir du lait de Vache, afin d'obtenir à la fois les quantités et la pureté désirées.

Du point de vue biologique, il est bien établi maintenant que l'angiogénèse représente une étape indispensable à la croissance d'une tumeur. Inhiber l'angiogénèse tumorale, revient donc à inhiber le développement de cette tumeur. Afin d'agir sur l'angiogénèse, il est donc nécessaire dans un premier temps de définir le mécanisme d'action des différents facteurs qui modulent les 3 grandes étapes de cette activité, c'est à dire, la migration, la différenciation et la prolifération cellulaire. En ce qui concerne l'angiogénine, notre travail a consisté à quantifier son activité angiogénique et à préciser son action sur la prolifération de différents types cellulaires. Sur la base des résultats obtenus, nous avons essayé de comprendre le mode d'action de l'angiogénine, en recherchant la présence éventuelle d'un récepteur membranaire.

Dans la première partie de notre mémoire, nous décrirons le protocole de purification de l'angiogénine que nous avons mis au point. Dans la deuxième partie nous aborderons l'étude des propriétés biologiques de l'angiogénine, essentiellement son activité angiogénique et mitogène. Enfin, dans la dernière partie, nous étudierons le récepteur de l'angiogénine que nous avons caractérisé sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf.

Notre travail a fait l'objet des publications et communications suivantes:

**PUBLICATIONS:**

- **Characterization of Angiogenin Receptors on Bovine Brain Capillary Endothelial Cells.** Chamoux M., Dehouck M.P., Fruchart J.C., Spik G., Montreuil J. and Cecchelli R. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:833-839.
- **Purification of Two Members of Ribonuclease Superfamily from Bovine Milk.** Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J. and Spik G. (1991) En préparation.

**COMMUNICATIONS:**

- **Correlation Between Mitogenic Effect and Binding of Angiogenin to Brain Capillary Endothelial Cells in vitro.** Chamoux M., Dehouck M.P., Fruchart J.C., Montreuil J., Spik G. and Cecchelli R. (1990) Biology of Vascular Cells, VI<sup>th</sup> International Paris Symposium, August 28-31.
- **Mise en évidence de l'activité mitogène de l'angiogénine du lait de Vache vis-à-vis des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf.** Chamoux M., Dehouck M.P., Cecchelli R., Montreuil J. et Spik G. (1990) XVII<sup>e</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Biochimie et Biologie Moléculaire, Villeneuve d'Ascq, 3-6 juillet.

Une partie de notre travail ne figurant pas dans ce mémoire, a également fait l'objet de la publication suivante:

- **A Novel Secreted Cyclophilin-like Protein (SCYLP).** Spik G., Haendler B., Delmas O., Mariller C., Chamoux M., Maes P., Tartar A., Montreuil J., Stedman K., Kocher H.P., Keller R., Hiestand P.C. and Movva N.R. (1991) J. Biol. Chem., 266:10735-10738.

# GENERALITES

## I - L'ANGIOGENESE

### A - DEFINITION DE L'ANGIOGENESE

Le système vasculaire assure l'acheminement du sang indispensable à la vie cellulaire, au niveau de chaque tissu. Dans les conditions normales, l'endothélium est soumis à un très faible renouvellement cellulaire qui se mesure en terme d'années.

La croissance vasculaire, appelée angiogenèse, n'apparaît qu'au cours du développement embryonnaire (Wagner, 1980; Bar, 1980), ou chez l'adulte dans certaines conditions physiologiques et pathologiques. Par exemple, la formation du placenta, la croissance générale et les cycles menstruels ne pourraient avoir lieu sans angiogenèse (Jacob et al., 1977; Gospodarowicz et Thakral, 1978). De même, en cas de réparation tissulaire (cicatrisation, régénération) après traumatisme, une angiogenèse peut se produire (D'Amore et Thompson, 1987). Au cours de ces différents mécanismes, les périodes d'angiogenèse sont relativement brèves et hautement régulées. Par contre, une angiogenèse non contrôlée se développe lors de maladies graves. Ainsi, lors de la rétinopathie diabétique, la vascularisation de la rétine conduit souvent à la cécité (D'Amore et Thompson, 1987). De même, la croissance de tumeur dépend de leur vascularisation (Folkman, 1971, 1972, 1985a).

Le mécanisme de l'angiogenèse n'est pas encore bien connu, de nombreux points restent obscurs notamment, les relations qui existent entre les différents types cellulaires participant à ce mécanisme restent à être établies. La compréhension de ce mécanisme permettra peut-être, par la suite, de stopper l'angiogenèse invasive qui apparaît lors du développement d'une tumeur.

## B - L'ANGIOGENESE TUMORALE

Deux principes fondamentaux aujourd'hui bien établis sont à la base de la compréhension de l'angiogenèse tumorale:

-La croissance de la plupart des tumeurs solides est dépendante de l'angiogenèse, de cette façon, le sang circulant amène les éléments nourriciers nécessaires à la prolifération des cellules tumorales;

-L'angiogenèse tumorale est induite directement ou indirectement par la tumeur elle-même.

Un foyer métastatique privé de sa néovascularisation arrête sa croissance dès que le volume tumoral est de 1 à 2 mm<sup>3</sup>. Si la formation de néovaisseaux est restaurée, la croissance tumorale redémarre. La distance maximale entre un foyer tumoral et le lit capillaire néoformé peut-être de 150 à 200 µm, distance qui permet encore la diffusion de l'oxygène. L'activité mitotique des cellules tumorales au sein d'un foyer métastatique diminue au fur et à mesure qu'augmente la distance de ces cellules aux capillaires les plus proches (Folkman et Klagsbrun, 1987a).

L'étude de la vascularisation tumorale, a permis d'élucider de nombreux aspects du mécanisme de l'angiogenèse. Notamment, deux expériences réalisées par Greenblatt et Shubik (1968), ont démontré que les tumeurs pouvaient induire la croissance de nouveaux capillaires, malgré leur séparation du lit vasculaire de l'hôte par un filtre millipore. Ces résultats ont alors suggéré l'existence de facteurs tumoraux diffusibles responsables de la stimulation de la croissance des néovaisseaux et le concept de facteurs angiogéniques tumoraux. Quelques années plus tard, Folkman et al. (1971) ont isolé d'une tumeur "Walker 256", un facteur soluble de nature polypeptidique qu'ils appelèrent "Tumor Angiogenesis Factor" (TAF). Par la suite, de nombreux facteurs angiogéniques ont été isolés de tissus sains.

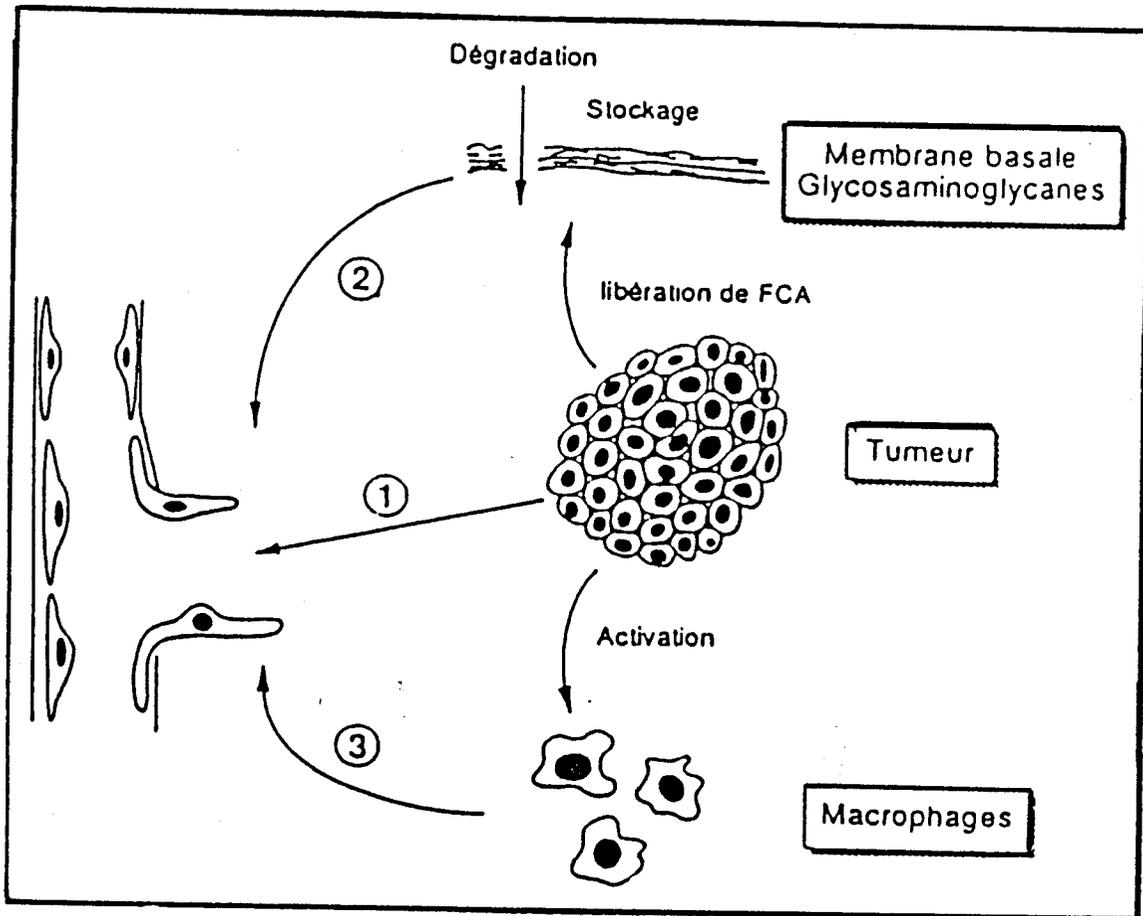
L'angiogenèse tumorale peut aussi être induite indirectement par la tumeur. Les macrophages présents dans un foyer tumoral sécrètent des facteurs capables de stimuler l'angiogenèse in vivo et in vitro (Leibovich et al., 1987; Hôckel et al., 1987). C'est l'activation des macrophages par des stimuli d'origine tumorale qui serait responsable de la sécrétion de facteurs angiogéniques.

Enfin, des enzymes telles que les collagénases et les héparanases, pourraient être sécrétées par les cellules tumorales; leur action sur la matrice extracellulaire entraînerait la libération de facteurs de croissance pour les cellules endothéliales (Bashkin et al., 1989).

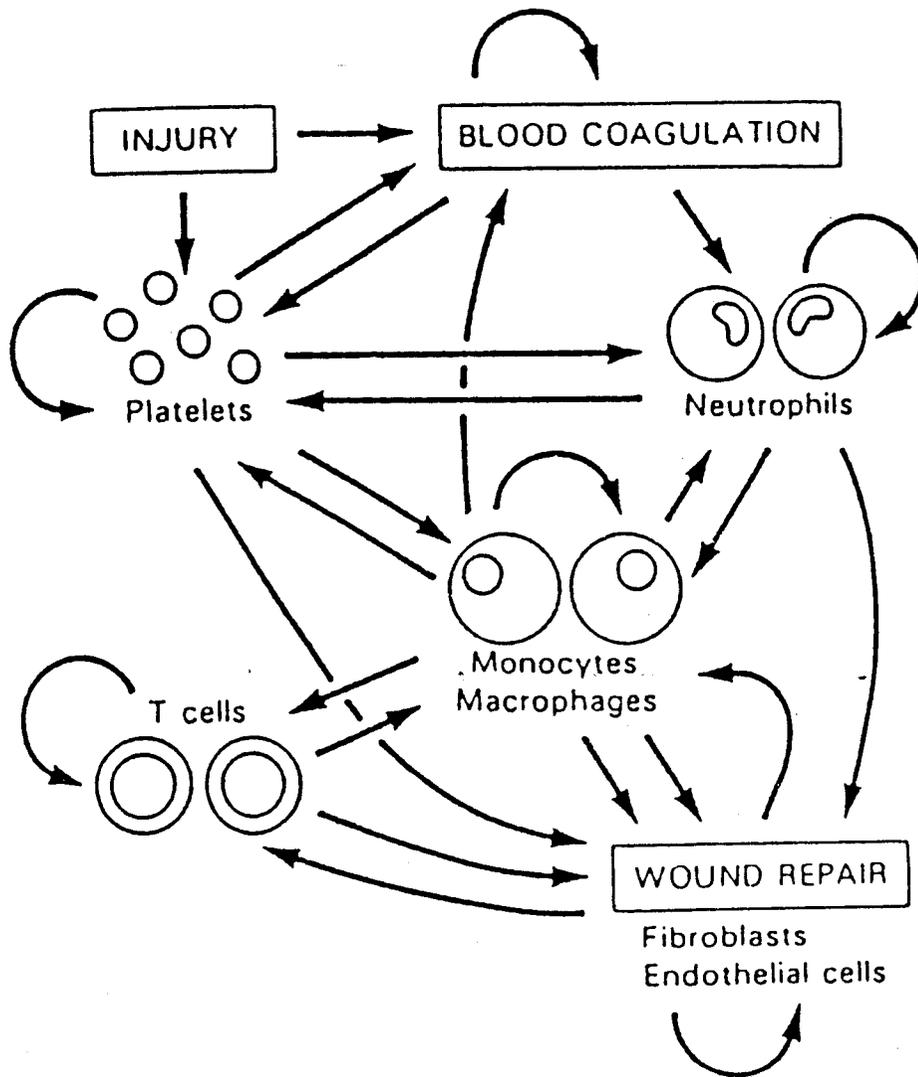
L'angiogenèse tumorale peut donc être en rapport avec un ou plusieurs de ces mécanismes (Fig.1, p.7). Elle assure la croissance tumorale et le développement des métastases.

## C - COMMUNICATIONS INTERCELLULAIRES AU COURS DE L'ANGIOGENESE

Lors de processus faisant intervenir l'angiogenèse, comme la cicatrisation des plaies, il y a initiation d'une série très ordonnée mais très complexe, d'interactions cellulaires et biochimiques (Fig.2,p.8). Les composantes cellulaires de ce mécanisme sont les cellules hématopoïétiques tels que les plaquettes, les leucocytes polymorphonucléaires, les lymphocytes ainsi que les monocytes et les cellules mésenchymateuses tels que les fibroblastes et les cellules endothéliales, chacune possédant une fonction bien déterminée (Shoshan, 1981; Wong et Wahl, 1990). Ces cellules sont attirées par le caillot sanguin et envahissent le tissu lésé dans un ordre déterminé par



**Figure 1 :** Angiogenèse tumorale (Tobelen, 1990). 1: Par libération directe de facteurs de croissance et angiogéniques (FCA). 2: Par dégradation de composants matriciels ayant stockés des FCA. 3: Par activation des macrophages avec libération secondaire des FCA.



**Figure 2 :** Intéractions cellulaires lors de la cicatrisation.

(Wong et Wahl, 1990)

de nombreux facteurs solubles relargués sur le lieu de l'inflammation, qui vont dirigés soit la prolifération soit la migration de ces différents types cellulaires.

Par exemple, les plaquettes vont produire le facteur de croissance plaquettaire (Platelet-Derived-Growth-Factor) qui est un facteur chimiotactique (Seppa et al., 1982) et un facteur de croissance des fibroblastes. Il ne stimule pas la prolifération des cellules endothéliales, mais ces cellules arrivant après les fibroblastes sont stimulées par des facteurs sécrétés par ces derniers (Birdwell et al., 1977).

Ces communications intercellulaires, vont entraîner la migration, la multiplication et la différenciation des cellules endothéliales issues de capillaires préexistants.

## D - LES CELLULES ENDOTHELIALES VASCULAIRES

### 1 - Historique

Avant ces dix dernières années, les concepts sur la physiologie endothéliale étaient très simples. Le revêtement intérieur des vaisseaux sanguins et du coeur semblait être une couche uniforme de cellules formant une surface protectrice et nonadhérente, permettant le transport de différentes substances.

Depuis, de nombreux travaux ont permis de comprendre l'ultrastructure des cellules endothéliales (Palade, 1960; Karnovsky, 1967), ainsi que leur interaction avec les plaquettes (Moncada et al., 1976; Booyse et al., 1975) et ont changé les points de vue sur la physiologie endothéliale. Le développement des cultures de cellules endothéliales (Jaffe et al., 1973; Gospodarowicz et al., 1976) a été une étape décisive, autant que l'a été le modèle des systèmes angiogéniques

(Grimbrone et al., 1974; Folkman, 1982). En fait, les cellules endothéliales possèdent de nombreuses fonctions que l'on peut regrouper dans les catégories suivantes: angiogenèse, coagulation, inflammation, réponse immunitaire, synthèse de composés cytoplasmiques, régulation vasculaire ainsi que des fonctions métaboliques spéciales. Ces fonctions sont décrites dans la revue de Fajardo (1989).

## 2 - Hétérogénéité des cellules endothéliales

Le point de vue selon lequel les cellules endothéliales sont identiques dans tout le système cardiovasculaire a été remis en question plusieurs fois. Maintenant, il est universellement reconnu que les cellules endothéliales sont morphologiquement et physiologiquement très différentes tout le long du réseau vasculaire, telle une adaptation biologique aux besoins locaux.

Une abondante littérature (Kumar et al., 1987) montre que le succès des techniques de culture des cellules endothéliales d'artères et de veines ne sont pas appropriées à celles des cellules endothéliales de microvaisseaux. Les rapides progrès réalisés ces dix dernières années dans la culture des cellules endothéliales microvasculaires indiquent que ces cellules sont fondamentalement différentes des cellules endothéliales de larges vaisseaux et que ces différences peuvent être utilisées pour comprendre et peut-être traiter les maladies du système microvasculaire.

La différence la plus frappante entre les cellules endothéliales des larges et des petits vaisseaux est leur morphologie. Par exemple, les cellules endothéliales d'aorte bovine en culture présentent une forme polygonale, constituant une monocouche adhérente avec de très petits

espaces extracellulaires (Fig.3,p.12); alors que les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf sont aplaties et allongées (Fig.4,p.12).

Les différences de propriétés physiologiques et biochimiques entre les cellules endothéliales de larges et de petits vaisseaux sont recensées dans les revues de Kumar et al.(1987) et de Zetter (1981). Rappelons simplement que l'angiogenèse ne se développe qu'à partir de capillaires ou de veinules mais jamais à partir de larges vaisseaux.

## E - LES ETAPES DE LA CROISSANCE D'UN CAPILLAIRE

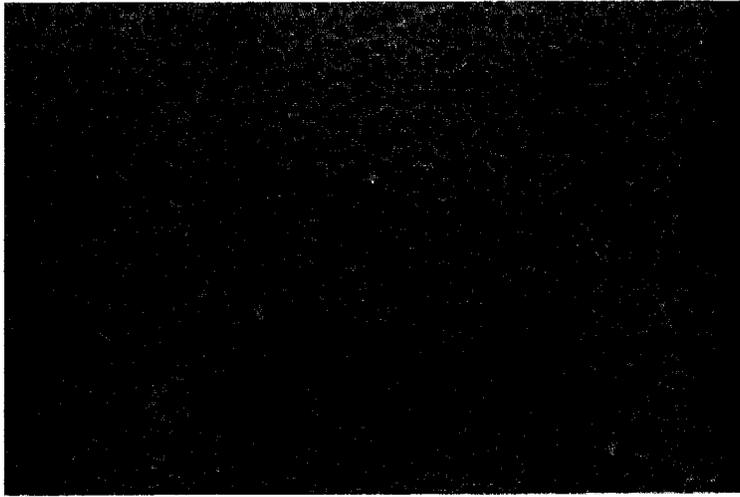
La croissance de capillaires in vitro et in vivo a fait l'objet de nombreuses études qui ont été rassemblées dans la revue de D'Amore et Klagsbrun (1989).

La formation d'un capillaire sanguin se fait en plusieurs étapes. La séquence des événements est pratiquement identique quel que soit la nature du stimulus, celui-ci pouvant être d'origine immunologique, inflammatoire, tumoral ou de réparation (Folkman, 1985a). Les néocapillaires vont se former à partir de capillaires normaux ou de veinules post-capillaires, par simple bourgeonnement. Les vaisseaux plus importants ne donnent généralement pas de bourgeons (Rifkin et al., 1982).

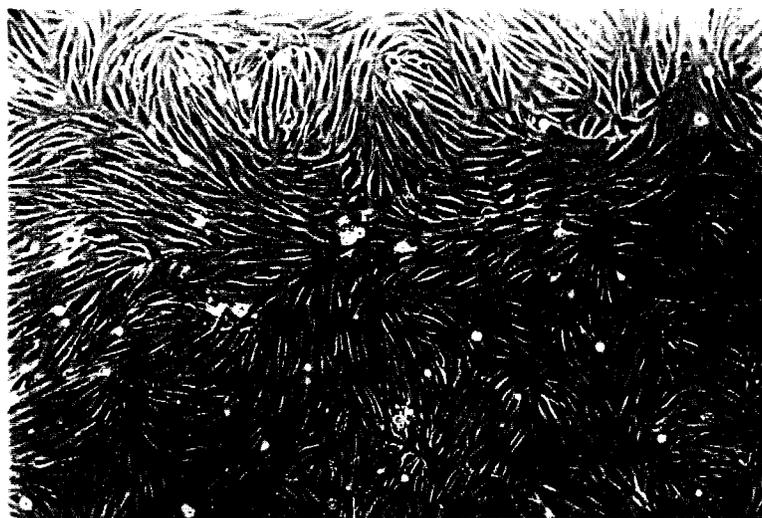
Les différentes étapes décrites ci-dessous sont également schématisées dans la figure 5 (p.13).

### 1 - Dégradation de la membrane basale

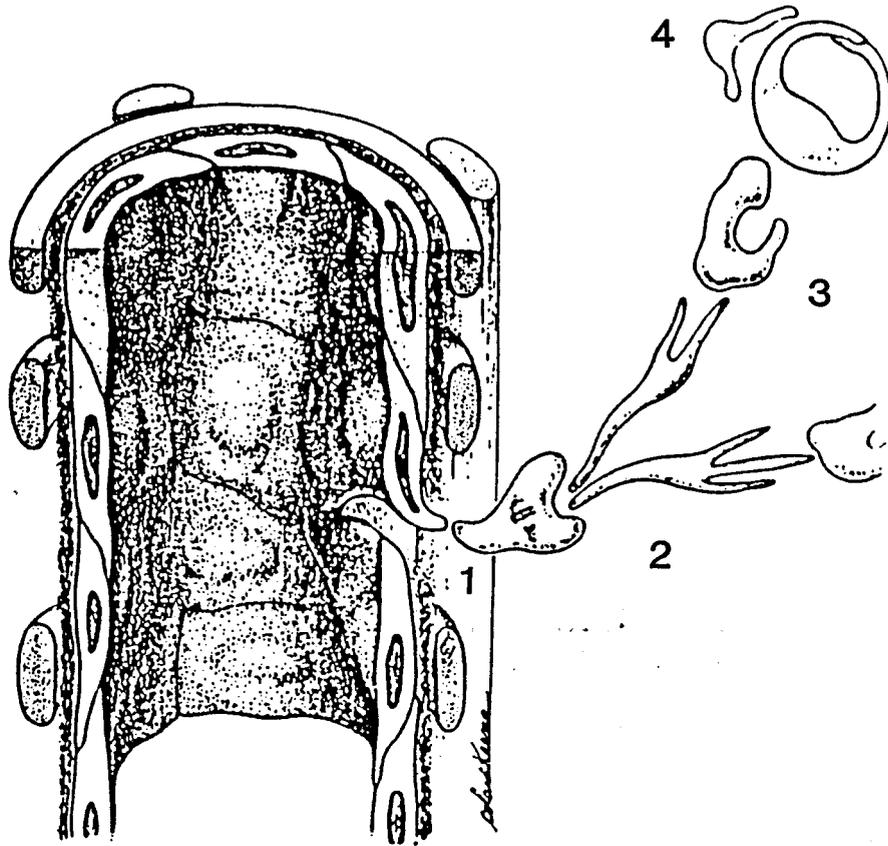
L'un des premiers événements de la formation du nouveau capillaire est une dégradation locale de la membrane basale sur la partie du



**Figure 3** : Cellules endothéliales d'aorte de Boeuf



**Figure 4** : Cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf



**Figure 5** : Représentation schématique de la croissance d'un capillaire sanguin (D'Amore et Thompson, 1987). 1: Dégradation de la membrane basale du capillaire sous l'action de protéases endogènes. 2: Bourgeonnement et migration des cellules endothéliales en direction du stimulus angiogénique. 3: Prolifération et formation en tube des cellules endothéliales, avec constitution d'une lumière. 4: Synthèse d'une nouvelle membrane basale.

vaisseau exposé au stimulus angiogénique. Cette dégradation pourrait résulter de l'action de protéases libérées par les cellules endothéliales elles-mêmes (Kalebic et al., 1983). Toutefois, il a été prouvé que la synthèse de l'activateur du plasminogène comme celle de la collagénase par des cellules endothéliales de capillaires bovins était augmentée de manière significative quand celles-ci étaient mises en présence, in vitro, d'une substance angiogénique (Gross et al., 1983). Cependant, cet effet n'a pu être observé sur les cellules endothéliales de l'aorte de Boeuf, ce qui peut être rapproché du fait que la néovascularisation à partir de vaisseaux importants est pratiquement inexistante.

## 2 - Migration cellulaire

Les cellules endothéliales commencent leur migration dans l'espace interstitiel, vers le stimulus angiogénique et au travers du "trou" formé dans la membrane basale.

Durant cette migration, les cellules endothéliales situées à l'extrémité du bourgeon, ainsi formé, commencent à se diviser. Cette division pourrait s'expliquer par la perte de l'inhibition de contact par suite de la rupture des liaisons intercellulaires due à la migration des cellules (Ausprunk et Folkman, 1977).

## 3 - Formation de la lumière du nouveau capillaire

C'est certainement l'étape la moins bien connue de la formation d'un capillaire. Des observations anciennes décrivaient la formation de la lumière comme résultant de l'ouverture d'un espace entre les membranes plasmiques des cellules adjacentes (Wagner, 1980). Ce

mécanisme intercellulaire suppose que les cellules endothéliales formant le capillaire conservent leur individualité.

Par la suite, dans le cas d'angiogenèse embryonnaire, la formation d'une vacuole intra-cellulaire a été décrite (Clark et Clark, 1939), les vacuoles de cellules contiguës pourraient fusionner pour ainsi former un "tube" (Folkman et Handenschild, 1980).

En fait, dans la plupart des cas d'angiogenèse post-embryonnaire, la formation de la lumière du capillaire semble impliquer le cytosquelette des cellules endothéliales, celles-ci s'enroulant sur elles-mêmes pour former une structure tubulaire (Ausprunk et Folkman, 1977; Folkman et Handenschild, 1980).

#### 4 - Prolifération cellulaire

Les cellules de la partie moyenne du bourgeon commencent à se diviser tandis que celles situées à son extrémité continuent généralement à migrer sans se diviser.

#### 5 - Formation d'une boucle

Des bourgeons individuels se rejoignent pour former entre eux des anastomoses. Ces boucles croissent et peuvent même être à l'origine de nouveaux bourgeons. Les boucles nouvellement formées convergent alors vers le stimulus angiogénique et la circulation sanguine peut commencer.

Des péricytes émergent ensuite le long du bourgeon et la synthèse de la membrane basale suit, terminant ainsi l'édifice (Folkman et Haudenschild, 1980).

F - LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE  
L'ANGIOGENESE

1 - Les modèles in vivo

a - La membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet

La méthode la plus simple et la plus employée pour l'étude de l'angiogenèse est la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet (CAM) (Ausprunk et al., 1974). La substance dont on veut déterminer l'activité angiogénique est implantée sur la CAM à travers une fenêtre réalisée dans la coquille (Folkman, 1974; Folkman et al., 1976) ou sur un embryon dépourvu de coquille cultivé en boîte de pétri (Auerbach et al., 1974; Klagsbrun et al., 1976; Folkman, 1985b). Le facteur angiogénique est dissout dans 10  $\mu$ l de méthyl cellulose 1 %, puis séché pour former un disque de 2 mm de diamètre (Crum et al., 1985) qui sera déposé sur la CAM. La substance angiogénique peut également être incorporée dans un polymère (copolymère d'éthylène vinyl acétate) (Langer et Folkman, 1976), déposée sur une pastille ou sur un filtre en papier. Généralement le facteur est appliqué sur un embryon de 6 à 10 jours, l'observation microscopique se faisant 2 à 3 jours après. L'activité angiogénique est révélée par croissance radiale des nouveaux capillaires.

Le test sur la CAM facilite la recherche de facteurs angiogéniques, il permet aussi de déterminer la courbe dose-réponse. Cependant, cet essai a de nombreux inconvénients (Ryan et Stockley, 1980; Ryan et Barnhill, 1983). Un faux test positif peut être induit par un matériel causant des dommages cellulaires telle qu'une mauvaise osmolarité, un

mauvais pH ou par des substances toxiques. De nombreuses substances peuvent également induire une réponse inflammatoire de la CAM.

Depuis peu, de nombreuses améliorations ont été apportées aux techniques de mesure de l'activité angiogénique sur la CAM, notamment par Splawinski et al. (1988) et par Kreisle et Ershler (1988).

#### b - La micropoche cornéenne

La technique de micropoche cornéenne surmonte quelques désavantages du test de la CAM. Dans ce test, le facteur angiogénique est implanté dans la cornée de Lapin (Gimbrone et al., 1974), de Souris (Muthukkaruppan et Auerbach, 1979) ou de Rat (Glaser et al., 1980). La substance à analyser est généralement incorporée dans une pastille de polymère (Langer et Folkman, 1976). La longueur et le nombre de nouveaux capillaires envahissant la cornée avasculaire peuvent être quantifiés périodiquement par observation au binoculaire ou à la fin de l'expérience par analyse d'images obtenues après injection d'encre de Chine (Proia et al., 1988).

L'inconvénient majeur de cette technique est le temps ainsi que le coût d'utilisation des lapins. En effet, le fait d'utiliser un lapin pour une seule substance à une seule concentration, limite considérablement le nombre de substances pouvant être analysées.

#### c - Les autres modèles in vivo

D'autres systèmes in vivo ont été utilisés: la poche dans la joue de Hamster (Schreiber et al., 1986), l'espace subcutané chez la Souris (Auerbach, 1981) ainsi que différentes chambres transparentes implantées en sous-cutané (Hobbs et Cliff, 1971).

Récemment, des éponges poreuses biodégradables (Thompson et al., 1988) ou nonbiodégradables (Davidson et al., 1985; Thomas et Gimenez-Gallego, 1986) ont été implantées chez les animaux, pour mesurer la croissance des vaisseaux sanguins attirés par le facteur angiogénique contenu dans l'éponge. Cette technique facilite l'étude histologique et immunologique des nouveaux vaisseaux sanguins, mais la quantification de la néovascularisation est plus difficile par rapport aux autres techniques.

## 2 - Les modèles in vitro

Une issue possible pour éclaircir la régulation de la croissance dans le système vasculaire, consiste à analyser la séquence d'événements nécessaires au développement d'un nouveau capillaire sanguin. Pour cela, il est nécessaire de caractériser chaque étape par utilisation de techniques analogues in vitro.

Les événements morphologiques qui apparaissent au cours de la croissance d'un nouveau capillaire, ont été décrites au paragraphe précédent.

Les tests in vitro, quantifiables, ont été développés pour la plupart de ces événements, par l'utilisation des cellules endothéliales de capillaires (Folkman et al., 1979), d'aorte (Gospodarowicz et al., 1976) ou de veine ombilicale (Jaffe et al., 1973; Maciag et al., 1982; Gimbrone et al., 1973).

L'effet des molécules angiogéniques sur la migration des cellules endothéliales in vitro est mesuré par chimocinétique utilisant l'or colloïdal (Zetter, 1980; Azizkhan et al., 1983).

La direction de migration de ces cellules est déterminée par chimiotactisme dans les chambres "Boyden".

Les mitoses des cellules endothéliales sont déterminées sur des cellules subconfluentes car les cellules confluentes sont généralement indifférentes à l'action des facteurs mitogènes (Handenschild et al., 1976).

La formation de la lumière du nouveau capillaire est étudiée grâce à des cultures de cellules endothéliales sur substrats tel que le collagène ou la fibronectine (Folkman et Haudenschild, 1980; Ingber et al., 1987).

Les facteurs angiogéniques stimulent une production croissante de l'activateur du plasminogène et de la collagénase par les cellules endothéliales (Rifkin et al., 1982; Gross et al., 1983). La quantification de ces activités enzymatiques, in vitro, représente un nouvel outil pour guider la purification de facteur angiogénique. Il a été montré in vitro que, quand il y a chimiotactisme des cellules endothéliales par stimulation par des facteurs angiogéniques, il y a une augmentation considérable des activités enzymatiques associées aux cellules et capables de dégrader le collagène de type IV et V (Kalebic et al., 1983).

### 3 - Conclusion

Il faut insister sur le fait que les techniques in vitro sont utilisées pour guider une purification de facteur angiogénique, mais les résultats doivent être confirmés in vivo. En effet, il est possible qu'un facteur mitogène in vitro ne soit pas angiogénique in vivo comme certaines lipoprotéines de densité faible.

Les techniques d'étude de l'angiogenèse sont difficiles à quantifier in vivo. Néanmoins, avec toutes les techniques existantes, il est

possible d'identifier, de caractériser et de purifier un grand nombre de facteurs angiogéniques que nous décrirons plus loin.

## G - CONCLUSION

L'angiogenèse comporte donc 3 grandes étapes (migration, différenciation, prolifération) intégrées dans le temps et dans l'espace par une série de signaux encore incomplètement connus. Par exemple, les mécanismes moléculaires de la formation des tubes, qui est une étape fondamentale de l'angiogenèse, ne sont pas encore élucidés.

## II - LES FACTEURS ANGIOGENIQUES

L'angiogenèse est sous le contrôle de nombreux facteurs angiogéniques. Ainsi, les modèles expérimentaux ont permis d'identifier et d'isoler certains facteurs angiogéniques à partir de tumeurs ou de tissus sains. La famille des facteurs angiogéniques a été décrite dans les revues générales de Folkman et Klagsbrun (1987a,b) et de D'Amore et Klagsbrun (1989).

### A - LES DIFFERENTES CLASSES DE FACTEURS ANGIOGENIQUES

Les facteurs angiogéniques forment un ensemble complexe et, pour une part, paradoxal. Ils diffèrent entre eux, par leur activité angiogénique in vitro.

## 1 - Les facteurs de croissance angiogéniques

Ces peptides sont angiogéniques in vivo et in vitro. Ce sont des facteurs de croissance des cellules endothéliales mais, également, de nombreux autres types cellulaires.

### a - Les facteurs de croissance fibroblastiques

Le terme facteur de croissance des fibroblastes (FGF) a été utilisé la première fois pour désigner un polypeptide cationique isolé des glandes pituitaires et du cerveau de Boeuf, peptide qui stimulait la division cellulaire de cellules 3T3 (Gospodarowicz, 1974; 1975). Ce polypeptide, connu comme le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF), possède une masse moléculaire de 17,000 à 18,000 et un point isoélectrique de 9,6 (Bohlen et al., 1984). Par la suite, il fût montré que le cerveau de Boeuf était source d'une autre espèce de FGF, de nature cationique, le FGF acide (aFGF) (Thomas et al., 1980). Ce aFGF est un polypeptide de 16 à 17 kDa, son point isoélectrique est de 5 (Thomas et al., 1984). Le bFGF et le aFGF possèdent 53 % d'homologie de séquence (Esch et al., 1985).

De plus récentes études indiquent qu'il existe des formes de FGF de hautes masses moléculaires (Sommer et al., 1987). En particulier, des formes de 22000 et 25000 ont été identifiées dans le cerveau de Cobaye et de Rat ou dans les cellules hépatiques de Rat (Moscatelli et al., 1987a; Presta et al., 1988; Iberg et al., 1989). La signification biologique de ces bFGF de masse moléculaire élevée est encore non connue.

L'affinité des FGF pour l'héparine est la plus importante de leurs propriétés (Maciag et al., 1984). L'affinité des FGFs pour l'héparine reflète une association qui se rencontre dans les cellules et les tissus. Le bFGF se fixe sur l'héparane sulfate des matrices extracellulaires subendothéliales (Vlodavsky et al., 1987) et des membranes basales (Folkman et al., 1988). Cette association protège ainsi les FGFs d'une dénaturation ou d'une dégradation.

Les deux FGF a et b sont angiogéniques sur la CAM et la cornée de Lapin à des doses de 10 à 100 ng (Folkman et Klagsbrun, 1987b). Cette activité angiogénique in vivo est compatible avec ses activités in vitro. Le FGF, in vitro, est mitogène et chimiotactique pour les cellules endothéliales, il stimule, chez les cellules endothéliales, la production de collagénase, d'activateur du plasminogène et de protéases capables de dégrader la membrane basale des capillaires (Gross et al., 1983). Le FGF induit également la migration des cellules endothéliales de capillaires dans les matrices tridimensionnelles du collagène pour former des capillaires (Montesano et al., 1986).

#### b - Le facteur de croissance transformant- $\alpha$

Le facteur de croissance transformant- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) est un polypeptide de 50 acides aminés, de masse moléculaire de 5500. Le TGF- $\alpha$  se fixe au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF), en effet, il possède 40 % d'homologie avec l'EGF (Marquadt et al., 1984). Le TGF- $\alpha$  a tout d'abord été décrit comme étant une forme mitogène sécrétée par les fibroblastes transformés (Todaro et al., 1980). Il est en fait sécrété par une grande variété de cellules

tumorales mais également par les cellules normales telles que les macrophages (Madtes et al., 1988).

Une importante propriété du TFG- $\alpha$  est sa capacité d'induire la transformation des cellules normales en cellules transformées par un processus irréversible.

A part les fibroblastes, le TGF- $\alpha$  stimule la prolifération de différents types de cellules en culture, telles que les cellules épithéliales et les cellules endothéliales (Derynck et al., 1984; Shreiber et al., 1986).

Le TGF- $\alpha$  est un facteur angiogénique in vivo, injecté en sous-cutané dans la joue de Hamster, 0.3 à 1  $\mu\text{g}$  de TGF- $\alpha$  vont stimuler la croissance des capillaires (Shreiber et al., 1986).

La synthèse du TGF- $\alpha$  par les tumeurs et les macrophages, couplée à son activité angiogénique, suggèrent que le TGF- $\alpha$  est sûrement un important médiateur de la vascularisation tumorale et de l'inflammation.

## 2 - Les facteurs angiogéniques non mitogènes pour les cellules endothéliales

Certains facteurs angiogéniques ne possèdent aucune activité sur la prolifération des cellules endothéliales (Angiotropine), ou alors ils inhibent cette croissance (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ).

### a - Le facteur de croissance transformant- $\beta$

Le facteur de croissance transformant- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) est un homodimère polypeptique possédant une masse moléculaire de 25000

(Sporn et al., 1987). Mise à part, la nomenclature, le TGF- $\beta$  est une protéine totalement différente du TGF- $\alpha$ . En fait, les TGF  $\alpha$  et  $\beta$  sont deux protéines structurellement différentes qui à l'origine ont été co-purifiées.

Le TGF- $\beta$  a tout d'abord été purifié des plaquettes, du placenta et des reins, puis à partir de nombreux tissus tel que le cartilage, les os et les cellules tumorales (Roberts et al., 1981; Assoian et al., 1983; Frolik et al., 1983; Seyedin et al., 1985).

Le TGF- $\beta$  est sécrété sous une forme biologique inactive ou latente. La forme latente peut-être activée par la chaleur, l'acidification ou des protéases (Lawrence et al., 1984, 1985; Keski-Oja et al., 1987). L'activation du TGF- $\beta$  latent par les protéases in vivo pourrait être un mécanisme de régulation de l'activité du TGF- $\beta$ .

Le TGF- $\beta$  est un régulateur multifonctionnel qui inhibe ou stimule la croissance des cellules (Sporn et Roberts, 1988). Il a tout d'abord été caractérisé comme facteur activant la croissance des fibroblastes normaux indépendamment de leur ancrage (Moses et al., 1985). Puis, il fût montré qu'il est inhibiteur de la croissance de certaines cellules telles que les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes (Tucker et al., 1984a; Frater-Schrober et al., 1986; Heimark et al., 1986; Anzano et al., 1986). Le TGF- $\beta$  augmente aussi considérablement la croissance des matrices extracellulaires, processus important dans la différenciation, par stimulation de la sécrétion des protéines des matrices et par inhibition de leur dégradation (Ignotz et Massague, 1986).

Il est aussi évident que le TGF- $\beta$  est un médiateur de l'angiogenèse in vivo. Quand on injecte, en sous-cutané, 1  $\mu$ g de TGF- $\beta$

dans la nuque d'une souris, après 2 à 3 jours, on entraîne la formation d'un tissu granuleux très vascularisé (Roberts et al., 1986). D'ailleurs, l'EGF et le PDGF provoque le même effet. D'un autre côté, le TGF- $\beta$  inhibe l'angiogenèse sur la CAM (Dugan et al., 1988). Le mécanisme de l'angiogenèse n'est plus très clair depuis qu'il a été montré que le TGF- $\beta$  inhibe la croissance des cellules endothéliales de capillaires et d'aorte en culture (Frater-Schoder et al., 1986; Heimark et al., 1986). Une explication possible à ceci pourrait être que le TGF- $\beta$  induit l'angiogenèse par induction de la différenciation des cellules endothéliales après leur phase de prolifération, peut-être par induction de la synthèse de la matrice.

Le TGF- $\beta$  est également très chimiotactique pour les cellules impliquées lors de la cicatrisation tissulaire, telles que les fibroblastes et les monocytes (Wahl et al., 1987), ces cellules pouvant être responsables de la production de facteurs angiogéniques, eux-mêmes mitogènes pour les cellules endothéliales.

#### b - Le facteur de nécrose tumorale

Le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) est un polypeptide possédant une masse moléculaire de 17000 (Haranaka et al., 1986; Beutler et al., 1985). Le TNF- $\alpha$  possède 28 % d'homologie structurale avec la lymphotoxine produite par les lymphocytes activés, connu sous le nom de TNF- $\beta$  (Gray et al., 1984).

Le TNF- $\alpha$  est synthétisé par les macrophages activés et par quelques cellules tumorales. C'est un polypeptide multifonctionnel, il est cytotoxique pour les cellules tumorales et il induit des nécroses hémorragiques dans les tumeurs (Carswell et al., 1975).

De nombreux groupes ont montré que le TNF- $\alpha$  était angiogénique (Leibovich et al., 1987; Frater-Schroder et al., 1987). En fait, on lui a revendiqué totalement l'activité angiogénique des macrophages (Leibovich et al., 1987). Dans ces études, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  stimule l'angiogenèse dans la cornée à 3.5 ng et dans la CAM à 1 ng sans aucune inflammation. Cependant, un autre groupe (Frater-Schroder et al., 1987) a montré que le TNF- $\alpha$  est angiogénique dans la cornée mais que de fortes concentrations sont nécessaires (5  $\mu$ g).

In vitro, le TNF- $\alpha$  stimule le chimiotactisme des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires sur du collagène de type I en culture (Leibovich et al., 1987). Pourtant, il est aussi inhibiteur de la prolifération cellulaire en culture (Leibovich et al., 1987; Frater-Schroder et al., 1987).

Le TNF- $\alpha$  est similaire au TGF- $\beta$  en de nombreux points. Ces deux polypeptides sont angiogéniques in vivo, ils activent la formation de tubes in vitro, mais ils inhibent la croissance des cellules endothéliales in vitro. Comme le TGF- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  est peut-être un promoteur de la différenciation des cellules endothéliales.

### c - L'angiotropine

L'angiotropine a été isolée à partir de culture de monocytes périphériques de Porc, activés par la concanavaleine A (Hockel et al., 1987, 1988). L'angiotropine est un polyribonucléopeptide associé à du cuivre, de masse moléculaire de 4500. A l'heure actuelle, sa séquence en acides aminés n'a pas été déterminée.

L'angiotropine n'est pas mitogène vis-à-vis des cellules endothéliales, mais elle stimule la migration de ces cellules. Ce facteur semble également jouer un rôle dans la différenciation des cellules endothéliales de capillaires en culture.

L'angiotropine induit l'angiogenèse dans la CAM (2500 pg), ainsi que dans la cornée. Injectée dans la peau du lobe de l'oreille d'un Lapin, l'angiotropine induit un changement phénotypique des cellules endothéliales des capillaires et des veinules postcapillaires, une dilatation vasculaire et enfin, l'angiogenèse.

L'angiotropine peut-être considérée comme étant un médiateur chimique produit par les macrophages, capable d'initier une cascade d'événements lors d'inflammation, de cicatrisation incluant l'angiogenèse. Comme le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$ , l'angiotropine n'est pas mitogène pour les cellules endothéliales. Le mécanisme d'action de l'angiotropine lors de l'angiogenèse n'a pas encore été élucidé.

### 3 - Les facteurs de croissance angiogéniques spécifiques des cellules endothéliales

Ces facteurs ont été décrits récemment, leur activité angiogénique n'est pas encore bien définie. Ils sont mitogènes pour les cellules endothéliales seulement, ils n'ont aucune activité sur d'autres types cellulaires. Cette propriété qui les distingue des autres facteurs angiogéniques reste à être vérifiée.

a - Le facteur de croissance des cellules endothéliales  
d'origine plaquettaire

Le facteur de croissance des cellules endothéliales, d'origine plaquettaire (PD-ECGF) est un facteur de croissance décrit et purifié récemment (Miyazono et al., 1987). Le PD-ECGF est un polypeptide acide possédant un masse moléculaire de 4500, son point isoélectrique est de 4.8. Contrairement au FGF, il ne se fixe pas sur l'héparine, l'héparine n'intervient pas dans son activité biologique.

Le PD-ECGF possède deux propriétés intéressantes. Tout d'abord, il est le seul facteur de croissance des cellules endothéliales produit par les plaquettes. En effet, il a été décrit que les plaquettes produisent de nombreux facteurs de croissance, dont, le PDGF mais ce facteur n'est pas mitogène pour les cellules endothéliales, le TGF- $\beta$  qui est lui inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales, et enfin, l'EGF qui lui possède un pouvoir mitogène très faiblement exprimé envers les cellules endothéliales. La seconde propriété intéressante du PD-ECGF est son pouvoir de stimulation des cellules endothéliales humaines et porcines d'aorte ou de capillaires, mais surtout son inactivité envers les fibroblastes humains (Miyazono et al., 1987). Si ces résultats étaient confirmés pour d'autres types cellulaires, le PD-ECGF posséderait une propriété qui le distinguerait des autres facteurs angiogéniques, celle d'activer spécifiquement les cellules endothéliales.

En plus de son pouvoir mitogène, le PD-ECGF est aussi angiogénique in vivo sur la CAM (Ishikawa et al., 1989). In vitro, ses activités sont identiques à celles du FGF, il stimule la prolifération et le chimiotactisme des cellules endothéliales.

A l'heure actuelle, il n'y a pas encore d'hypothèse décrite sur le rôle du PD-ECGF comme médiateur de l'angiogenèse in vivo.

#### b - La vasculotropine

Un nouveau facteur de croissance, la vasculotropine, a été purifié à partir de milieu de culture de cellules tumorales AtT-20 dérivées de glandes pituitaires antérieures de Souris (Plouët et al., 1989). La vasculotropine est un homodimère constitué de deux sous-unités de 23 kDa chacune.

Ce facteur stimule la prolifération des cellules endothéliales vasculaires dérivant du cerveau (BBC), de microvaisseaux ou de veines ombilicales humaines. Cependant, il a été montré que la vasculotropine n'entraîne aucune réponse mitogène sur des cellules d'origines diverses comme l'endothélium cornéen, le cortex surrénalien, les kératinocytes, les cellules musculaires lisses ou les cellules de rein de Hamster nouveau-né (clone 21), en fait, des cellules connues pour répondre à une grande variété de facteurs de croissance (Plouët et al., 1989).

La vasculotropine est angiogénique in vivo sur la CAM, 200 ng de facteur sont nécessaires pour induire la néovascularisation (Plouët et al., 1989).

La vasculotropine, comme le PD-ECGF, semble posséder une activité restreinte sur les cellules endothéliales vasculaires.

#### c - Le facteur angiogénique tumoral

Le facteur angiogénique tumoral (TAF) a été isolé à partir de cellules de carcinome de Rat, Walker 256, par Folkman et coll. en 1971,

puis purifié en 1979 (Weiss et al.), ce composé a une masse moléculaire de 200 environ.

Le TAF induit la néovascularisation in vivo. Il fût ensuite démontré que le TAF n'est pas seulement angiogénique in vivo, mais que in vitro il est également mitogène pour les cellules endothéliales, de même qu'il induit la formation en tube de ces mêmes cellules (Shor et al., 1980; Ishiwata et al., 1990). Cette activité facteur de croissance a été recherchée sur différents types de cellules endothéliales, les cellules de capillaires cérébraux de Boeuf, d'aorte de Boeuf et de Porc (Keegan et al., 1982). Les expériences montrèrent que le TAF n'est mitogène que pour les cellules endothéliales de capillaires. Ces résultats montrent que dans l'angiogenèse, l'origine des cellules est très importante.

Le TAF fait donc partie d'une famille particulière de facteurs angiogéniques, les facteurs n'agissant que sur les cellules endothéliales de capillaires, cellules qui sont seules capables de bourgeonner pour donner naissance à un nouveau vaisseau sanguin.

Le TAF, en tant que facteur agissant uniquement sur les cellules endothéliales de capillaires, doit jouer un rôle très important dans le transfert d'informations des cellules tumorales aux cellules endothéliales de capillaires. Ainsi, la croissance de la tumeur pourrait être stoppée si le TAF pouvait être inhibé, en effet, il n'y aurait plus formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour apporter les nutriments nécessaires au développement de la tumeur (Folkman et al., 1971).

d - Les autres facteurs angiogéniques spécifiques  
des cellules endothéliales

Quelques peptides angiogéniques ont été purifiés à partir de milieux de culture. Parmi eux, nous pouvons citer le facteur de perméabilité vasculaire (VPF) isolé de milieu de culture de cellules tumorales de Cobaye (lignée 10) (Senger et al., 1987; Connolly et al., 1989), ou encore le facteur vasculaire de croissance endothéliale (VEGF) purifié de milieu de culture de cellules folliculaires de glandes pituitaires bovines (Ferrara et Henzel, 1989; Leung et al., 1989).

Ces facteurs sont angiogéniques in vivo et in vitro, ils sont mitogènes pour les cellules endothéliales de vaisseaux et de capillaires. Ils ne possèdent aucune activité sur la croissance d'autres types cellulaires en culture.

4 - Les autres facteurs angiogéniques

Un certain nombre de composés de faible masse moléculaire ont été décrits comme étant angiogéniques. Ils sont isolés de tumeurs, de macrophages, du sérum ou encore de la graisse, pour n'en mentionner que quelques uns. Parmi ces facteurs, nous trouvons des métabolites très bien connus, telles que les prostaglandines PGE<sub>1</sub> et PGE<sub>2</sub> (Form et Auerbach, 1983; Ziche et al., 1982), et le nicotinamide (Kull et al., 1987), aussi bien que des molécules très peu connues.

En général, ces composés sont angiogéniques sur la CAM et dans la cornée de lapin mais non mitogènes pour les cellules endothéliales en culture. Il est très difficile d'attribuer un rôle de médiateur de

l'angiogénèse à ces composés de faibles masses moléculaires de nature non peptidique.

## 5 - Conclusion

Il existe donc 3 grandes classes de facteurs angiogéniques: (1) les facteurs de croissance actifs envers divers types cellulaires qui en plus de cette activité sont angiogéniques, (2) les facteurs qui possèdent une activité angiogénique mais qui ne sont pas mitogènes pour les cellules endothéliales, et enfin, (3) les facteurs de croissance angiogéniques qui eux, ont pour particularité, d'être spécifiques des cellules endothéliales.

Notons, que volontairement nous n'avons pas parlé de l'angiogénine, en effet, nous décrirons, en détail, les propriétés de ce peptide dans la dernière partie de ces Généralités.

## B - REGULATION PHYSIOLOGIQUE DES FACTEURS ANGIOGENIQUES

### 1 - Les mécanismes d'action des facteurs angiogéniques

Les facteurs angiogéniques possèdent des propriétés biologiques très diversifiées: une activité mitogène envers les cellules endothéliales, une activité chimiotactique envers ces mêmes cellules et une capacité de stimulation de leur formation en tube capillaire. Un résumé des différentes activités des facteurs angiogéniques les mieux connus se trouve dans le tableau I (p.33).

**Tableau I** : Propriétés biologiques des facteurs angiogéniques polypeptidiques (Klagsbrun et Folkman, 1990). ND: Non déterminé; INH: Inhibiteur.

Facteurs angiogéniques	Angiogenèse in vivo	Cellules endothéliales			
		Prolifération	Migration	Tube	Spécificité
FGF	+	+	+	+	-
TGF- $\alpha$	+	+	ND	ND	-
TGF- $\beta$	+	INH	ND	+	-
TNF- $\alpha$	+	INH	+	+	-
Angiotropine	+	INH	+	ND	-
PD-ECGF	+	+	+	ND	+
Vasculotropine	+	+	+	ND	+
Angiogénine	+	ND	ND	ND	ND

Les propriétés différentes suggèrent que ces facteurs angiogéniques peuvent agir par différents mécanismes. Certains facteurs angiogéniques sont mitogènes pour les cellules endothéliales (FGF, TGF- $\alpha$ , PD-ECGF), d'autres sont inhibiteurs de la croissance de ces cellules (TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , angiotropine). Alors que le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$  inhibent la croissance des cellules endothéliales, ils sont aussi capables de stimuler la formation en tube de celles-ci, ces observations suggèrent que ces polypeptides jouent un rôle dans la différenciation des cellules endothéliales. Ces observations montrent que l'angiogenèse est une suite de plusieurs événements, nécessitant l'intervention de nombreux facteurs. Peut-être que les facteurs agissant sur la prolifération des cellules endothéliales rendent ces cellules compétentes pour les autres facteurs angiogéniques qui vont eux stimuler la différenciation et le développement des vaisseaux sanguins.

Cette diversité d'activité des facteurs angiogéniques peut être expliquée par un mécanisme selon lequel certains facteurs peuvent agir directement sur les cellules endothéliales pour stimuler leur mouvement, leur division ou leur formation en tube. Ainsi, les autres facteurs angiogéniques peuvent eux agir indirectement, comme stimulants de la production de facteurs angiogéniques par d'autres cellules, qui eux iront stimuler directement les cellules endothéliales. Le macrophage pourrait être un des acteurs de ce scénario. En effet, à l'heure actuelle il a été décrit que le macrophage produit quatre facteurs angiogéniques, le FGF, le TGF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$  et le TNF- $\alpha$ . Le FGF produit par les macrophages et stocké dans les membranes basales, est un bon candidat comme facteur agissant via un mécanisme direct. De même, il est évident que de nombreux facteurs angiogéniques, particulièrement les facteurs de faible masse moléculaire, associés à l'inflammation, agissent indirectement via les macrophages pour stimuler l'angiogenèse.

Finalement, il faut tout de même considérer que les activités biologiques mesurées in vitro ne reflètent pas forcément ce qui se passe in vivo. Les cellules endothéliales vasculaires sont polarisées, avec une face luminale et une membrane basale sur l'autre face. In vitro, les facteurs angiogéniques ajoutés au milieu de culture interagissent avec la face luminale, alors qu'in vivo, ces mêmes facteurs angiogéniques ont la possibilité d'agir sur la face intravasculaire luminale ou sur la membrane basale côté extravasculaire. Il est tout à fait évident que les effets des facteurs angiogéniques sur l'endothélium in vivo sont dépendants du site de fixation de ces facteurs sur celui-ci (Folkman et Klagsbrun, 1987a).

## 2 - Contrôle de l'activité des facteurs angiogéniques

De nombreux facteurs angiogéniques sont disponibles, il est maintenant nécessaire de comprendre comment se réalise la formation d'un nouveau réseau de capillaires.

De nombreuses questions sont encore sans réponse. Par exemple, pourquoi dans la plupart des tissus sains, la prolifération des cellules endothéliales vasculaires est extrêmement lente, leur temps de renouvellement se mesure en année, alors que les facteurs angiogéniques sont, pour la plupart, isolés de tissus sains (Denekamp, 1984). Comment ces facteurs sont maintenus sous une forme inactive, tout en gardant le potentiel de devenir des facteurs mitogènes actifs, permettant ainsi durant des périodes d'angiogenèse (ovulation, cicatrisation des plaies), une prolifération rapide des cellules endothéliales avec un renouvellement mesuré en jour (Denekamp, 1984). Contrairement à ceci, la prolifération des cellules endothéliales de capillaires, lors de tumeur, est dramatiquement accélérée. Comment cette

activité mitogène des facteurs de croissance des cellules endothéliales tel que le FGF, rend compte de la capacité des cellules endothéliales à former un réseau complexe de capillaires, à la place d'un simple faisceau de cellules demeure inexpliqué de nos jours.

Ces questions suggèrent que les facteurs angiogéniques n'agissent pas seuls, leur action finale sur une cellule cible doit être déterminée par les conditions environnantes. Sporn et Roberts (1988) ont suggéré que l'activité des facteurs angiogéniques dépend de la présence d'autres molécules solubles et régulatrices. Par exemple, l'action du FGF peut dépendre d'autres facteurs solubles, mais aussi, de la présence de complexes insolubles tel que l'héparane sulfate (Ingber et al., 1987).

Au niveau moléculaire, la régulation peut se faire via: (1) le contrôle de l'expression génique des gènes des facteurs de croissance, (2) des modifications post-transcriptionnelles de ces facteurs. Au niveau cellulaire, (3) les facteurs angiogéniques peuvent être séquestrés pour limiter leur activité, (4) leur relarguage peut être régulé ou (5) la sensibilité des cellules endothéliales à ces facteurs peut être elle-même modulée. Finalement, (6) l'action de ces facteurs, au niveau tissulaire, peut être limitée via des interactions de stimulateurs angiogéniques avec des inhibiteurs angiogéniques spécifiques.

Le stockage du FGF est un très bon exemple de modulation de l'angiogenèse. Des études ont montré que le bFGF est localisé dans les membranes basales des cellules endothéliales (Vlodavsky et al., 1987; Folkman et al., 1988). L'activité associée à la membrane basale peut être supprimée par une incubation avec de l'héparine ou de l'héparane sulfate mais pas par un autre glycosaminoglycane. De plus, un traitement préalable des matrices extracellulaires par de l'héparinase ou de l'héparitinase,

empêche la fixation du bFGF, prouvant, de toute évidence, une interaction entre le FGF et l'héparine des matrices extracellulaires. Nous pouvons ainsi penser que des enzymes héparinase-like pourraient agir pour mobiliser le FGF de son site de stockage dans les membranes basales lors de l'angiogenèse. Cette hypothèse est particulièrement intéressante quand on sait que les cellules tumorales métastatiques produisent des héparinases lors du processus de migration à travers les membranes basales (Vlodavsky et al., 1983).

### 3 - Les inhibiteurs angiogéniques

La stratégie pour inhiber l'angiogenèse pathologique pourrait être dirigée vers deux cibles: les facteurs angiogéniques ou les cellules endothéliales. Pour les premiers cités, la stratégie sera de bloquer leur expression, leur production ou encore de neutraliser leur activité. Envers les cellules endothéliales la stratégie sera de bloquer leur réponse aux facteurs angiogéniques. Tous les inhibiteurs angiogéniques connus opèrent sur cette dernière base.

#### a - Les premiers inhibiteurs angiogéniques

Le premier inhibiteur angiogénique a été découvert dans le cartilage (Brem et Folkman, 1975). L'injection de ce facteur dans le lit vasculaire d'une tumeur de l'oeil de souris, entraîne la régression de la tumeur (Langer et al., 1980). Le problème pour l'utilisation de ce facteur se situe dans la faible quantité de produit disponible. La protamine a ensuite été présentée comme inhibiteur angiogénique (Taylor et Folkman, 1982) mais son administration prolongée s'accompagne d'une

toxicité importante, la protamine est donc également inutilisable pour des études in vivo.

b - Les stéroïdes angiostatiques et l'héparine

Une inhibition importante de l'angiogenèse est obtenue avec des mélanges de cortisone ou d'hydrocortisone avec de l'héparine (Folkman et al., 1983). Les propriétés anti-angiogéniques des corticostéroïdes sont dissociables de leurs propriétés anti-inflammatoires (glucocorticoïdes) et minéralocorticoïdes (Crum et al., 1985). De nombreux membres de la famille des stéroïdes angiostatiques ne sont connus que pour leur capacité à inhiber l'angiogenèse, donc de régression de tumeur.

Le fait que l'héparine soit nécessaire pour la manifestation de l'activité anti-angiogénique des stéroïdes angiostatiques, est curieux, même inexplicable. Cette propriété de l'héparine est indépendante de ses propriétés anticoagulantes. En effet, des fragments d'héparine non-anticoagulants sont parfois meilleurs que l'héparine comme facteurs synergiques avec les stéroïdes. Cependant, cette capacité de l'héparine dépend beaucoup, pour son intensité, de ses origines, les préparations d'héparine n'étant jamais identiques. Ce problème est actuellement surmonté grâce à la découverte des deux substituts de l'héparine pour cette activité: un peptidoglycane dérivé de bactéries et les  $\beta$ -cyclodextrines tétradéca-sulfate (Folkman et al., 1989).

Des études d'immunofluorescence utilisant des anticorps anti-fibronectine, anti-laminine ou anti-collagène, composés majeurs des membranes basales vasculaires, ont montré que durant la régression des tumeurs dues aux mélanges de stéroïdes et d'héparine, il y a

fragmentation de la membrane basale des capillaires en croissance (Ingber et al., 1986). Les cellules endothéliales de capillaires s'arrondissent, certaines se séparent de leur matrice extracellulaire, ceci conduisant à la rétraction des bourgeons capillaires.

Les stéroïdes angiostatiques n'induisent pas la dégradation des capillaires au repos, ni des veines ou des artères. Cette spécificité est peut-être basée sur le taux élevé de renouvellement des membranes basales lors de la croissance de capillaires nouveaux.

#### c - Conclusion

La question centrale dans le domaine de l'inhibition de l'angiogenèse est de savoir s'il sera possible de supprimer l'expression de l'activité angiogénique à sa source, soit dans les tumeurs, soit dans les tissus sains. A l'heure actuelle, il est nécessaire de continuer à identifier des inhibiteurs angiogéniques pouvant bloquer la réponse des cellules endothéliales envers divers facteurs angiogéniques.

### C - LES RECEPTEURS DES FACTEURS

#### ANGIOGENIQUES

Il est connu depuis longtemps que les signaux qui conduisent au développement des activités biologiques des facteurs de croissance sont transmises à la cellule par des récepteurs membranaires. Cependant, il n'y a que depuis quelques années que l'on commence à bien connaître la structure de ces récepteurs (Czech et al., 1990).

Les différents récepteurs de facteur de croissance sont décrits dans le livre de Sporn et Roberts (1990).

### 1 - Le récepteur des facteurs de croissance fibroblastiques

Les cellules répondant à l'action des FGFs possèdent un récepteur spécifique du FGF correspondant. Les protéines membranaires qui fixent les FGFs avec une grande affinité et une grande spécificité, ont été identifiées sur de nombreuses cellules telles que les cellules de rein de Hamster nouveau-né (BHK) (Neufeld et Gospodarowicz, 1985), les cellules endothéliales (Friesel et al., 1986), les cellules de muscle lisse (Winkles et al., 1987), les fibroblastes (Olwin et Hauschka, 1986), les cellules épithéliales de cristallin (Moenner et al., 1986) ainsi que sur de nombreuses cellules tumorales (Moscatelli et al., 1987b).

Le récepteur protéique apparaît être un polypeptide monomérique de 110 à 150 kDa suivant le type cellulaire. Les récepteurs ont été purifiés à partir de cerveau de Rat (Imamura et al., 1988) par chromatographie d'affinité sur lectine et sur ligand. Ces récepteurs sont associés à une activité tyrosine kinase (Huang et Huang, 1986). Ces protéines fixent les FGFs avec une haute affinité ( $K_d=10-80$  pM), le nombre de récepteurs est de 2000 à 80000 par cellule.

Une partie de la masse moléculaire du récepteur à haute affinité est constituée de glycannes (10 à 45 kDa). Ces sucres sont liés N-glycosidiquement et apparaissent nécessaires pour la fixation du FGF, ils ne sont pas apparentés à l'héparine (Feige et Baird, 1988).

## 2 - Le récepteur du facteur de croissance transformant $\alpha$

De nombreux auteurs reconnaissent que les activités biologiques de tous les membres de la famille de l'EGF sont transmises par un récepteur commun, connu comme le récepteur de l'EGF. Le TGF- $\alpha$  fait partie de la famille de l'EGF (Derynck, 1990), cependant, compte-tenu du fait que l'activité du TGF- $\alpha$  et de l'EGF sont différentes et que des sous-types de récepteurs sont connus ou suspectés pour d'autres systèmes, par exemple hormonaux, il persiste des doutes sur la question de l'existence d'un seul type de récepteur de l'EGF. A l'heure actuelle, il n'existe pas de preuves expérimentales prouvant la présence de différents types de récepteurs de l'EGF.

Un certain nombre de revues sont disponibles sur le sujet du récepteur de l'EGF (Carpenter, 1987; Gill et al., 1987; Yarden et Ullrich, 1988; Schessinger, 1988; Staros et al., 1989).

## 3 - Le récepteur du facteur de croissance transformant $\beta$

L'activité du TGF- $\beta$  est transmise par l'intermédiaire d'une fixation spécifique sur des récepteurs membranaires. A l'heure actuelle, la fixation du TGF- $\beta$  a été mise en évidence sur environ 150 types cellulaires différents, mise à part quelques exceptions, toutes ces cellules fixent le TGF- $\beta$  avec une affinité de l'ordre de la picomole (Frolik et al., 1984; Tucker et al., 1984b; Massagué et Like, 1985; Wakefield et al., 1987).

La liaison du TGF- $\beta$  au récepteur membranaire par l'intermédiaire du disuccinimidyl subérate a révélé 3 classes distinctes de composés membranaires qui fixent le TGF- $\beta$  spécifiquement et avec une haute affinité (Segarini et Seyedin, 1988; Cheifetz et al., 1988a,b).

Il existe à l'heure actuelle, une grande controverse concernant le rôle de ces différentes classes de protéines fixant le TGF- $\beta$  (Cheifetz et al., 1988a,b; Jennings et al., 1988; Segarini et al., 1989).

#### D - CONCLUSION

Les questions qui peuvent être posées sont les suivantes:

Existe-t-il encore des facteurs angiogéniques non identifiés? De nombreux facteurs ont été purifiés, séquencés, clonés, d'autres sont peu caractérisés et doivent encore être purifiés.

Existe-t-il des inhibiteurs angiogéniques naturels dans le corps humain? Les inhibiteurs angiogéniques connus (stéroïdes angiostatiques) sont des inhibiteurs synthétiques, mais comme l'angiogenèse est un événement rare, il est plausible qu'il existe des inhibiteurs naturels. Certaines sources d'inhibiteurs ont été décrites: les péricytes produisant des facteurs inhibiteurs de la croissance des cellules endothéliales (Orlidge et D'Amore, 1988), ainsi que d'autres sources cellulaires saines (Rastinejad et al., 1989).

Quel est le rôle physiologique normal des facteurs angiogéniques?

Comment l'angiogenèse est-elle régulée dans les tissus sains?

Comment l'angiogenèse est-elle induite dans les tumeurs?

Comment un large vaisseau sanguin se forme-t-il? Les vaisseaux sont formés de cellules endothéliales comme les capillaires mais aussi de cellules musculaires, comment cet assemblage est-il réalisé ?

Toutes ces questions sont importantes, elles sont à l'heure actuelle sans réponse précise.

### III - ETUDE ET PROPRIETES D'UN FACTEUR ANGIOGENIQUE: L'ANGIOGENINE

#### A - ORIGINE DE L'ANGIOGENINE

##### 1 - Isolement et purification

L'angiogénine humaine a été isolée et purifiée en 1985 par Fett et coll., à partir de milieu de culture de cellules d'adénocarcinome humain HT29. Sa purification a été réalisée par chromatographie d'échange de cations, suivie d'une chromatographie en phase réverse. Ces auteurs ont ainsi isolé 0.5  $\mu\text{g}$  d'angiogénine par litre de milieu de culture.

Plus tard, Shapiro et coll. (1987a) ont mis en évidence l'angiogénine dans le plasma de sujets sains, à des concentrations plus importantes, variant de 60 à 150  $\mu\text{g}$  par litre. Cette angiogénine présente une identité chimique totale avec celle sécrétée par les cellules tumorales. L'angiogénine humaine n'est donc pas un facteur angiogénique impliqué uniquement dans l'angiogenèse tumorale.

L'angiogénine humaine est désormais produite par génie génétique. Deux réalisations ont été faites dans ce domaine. L'une classique, a consisté à transformer des cellules de rein de Hamster nouveau-né par des séquences d'ADN dérivées du gène codant pour l'angiogénine humaine (Kurashi et al., 1988). Après expression de l'insert, l'angiogénine recombinante a été purifiée et les propriétés biologiques de l'angiogénine ont été conservées. La deuxième réalisation a consisté à synthétiser chimiquement le gène codant pour l'angiogénine humaine puis à le faire s'exprimer dans Escherichia coli (Denefle et al., 1987; Shapiro et al., 1988a) où elle représente alors, 5 à 10 % des protéines totales.

En 1990, Kimura et al. ont également réussi à synthétiser chimiquement l'angiogénine humaine, ce peptide conservant ses propriétés angiogéniques.

En 1988, au Laboratoire, l'angiogénine a été isolée du lait de Vache (Mäes et al., 1988), cette découverte et la technique de préparation ont fait l'objet d'un brevet international (Spik et al., 1988). Elle présente 65 % d'homologie structurale avec l'angiogénine humaine. L'angiogénine bovine est abondante dans le lait puisque les rendements obtenus sont de l'ordre de 100 à 500  $\mu\text{g}$  par litre. La même année, l'angiogénine a été purifiée à partir de plasma de Boeuf (Bond et Vallee, 1988). Cette angiogénine est identique à celle du lait de Vache, sa concentration varie de 30 à 80  $\mu\text{g}$  par litre de plasma. Ces auteurs ont également montré que la concentration en angiogénine est identique dans le plasma de Boeuf et dans le sérum de Veau foetal.

Récemment, le DNA de l'angiogénine de Souris a été isolé et séquencé (Bond et Vallee, 1990a). La séquence protéique dérivant du DNA présente 76 % d'homologie avec celle de l'angiogénine humaine, de plus, elle correspond à celle d'une protéine isolée à partir de sérum de Souris et identifiée comme l'angiogénine de Souris. Le coût du sérum de Souris n'a pas permis d'obtenir des quantités suffisantes de cette protéine pour permettre de déterminer sa structure totale. Le clonage est donc un bon moyen pour produire de l'angiogénine murine.

## 2 - Localisation

La distribution de l'ARNm de l'angiogénine humaine a été étudiée par des expériences d'hybridation (Rybak et al., 1987). L'expression de l'ARNm de l'angiogénine n'est pas limitée aux cellules néoplasiques et a été visualisée dans les cellules épithéliales normales, les fibroblastes et

les lymphocytes humains circulants. Dans ces dernières, cette expression peut être amplifiée par l'induction d'agents mitogènes.

Par contre, dans les fibroblastes transformés, la quantité d'ARNm codant pour l'angiogénine n'est pas supérieure à celle contenue dans les fibroblastes normaux, ce qui démontre que la transformation néoplasique ne se traduit pas obligatoirement par une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'angiogénine.

Dans une étude analogue, Weiner et al. (1987) montrent que l'expression du gène de l'angiogénine dans le foie de Rat évolue avec l'âge. Ainsi, les quantités d'ARNm codant pour l'angiogénine sont faibles dans le fœtus, augmentent chez le nouveau-né, pour atteindre un taux maximal chez l'adulte.

La protéine est principalement exprimée dans le foie et les quantités d'ARNm trouvées dans les cellules d'hépatome SK-Hep et dans les cellules d'adénocarcinome HT-29 diffèrent peu de celles trouvées dans le foie de Rat normal (Weiner et al., 1987).

En 1990, Weremowicz et al. ont localisé le gène codant pour l'angiogénine dans le génome humain, c'est une copie unique. Celui-ci est localisé sur la bande q11 du chromosome 14, ceci ayant été défini par hybridation "in situ" à l'aide d'une sonde constituée d'un fragment d'ADN génomique humain contenant le gène complet de l'angiogénine.

Cette bande q11 de ce chromosome 14 présente fréquemment des anomalies dans les cellules T tumorales. Des tumeurs sont aussi, fréquemment observées chez des patients atteints d'une maladie autosomale récessive (ataxia telangiectasia) (Spector et al., 1982) où

l'on observe des réarrangements de cette bande 11 du chromosome 14. La vascularisation excessive lors de cette maladie laisse penser qu'un inducteur de l'angiogenèse peut-être impliqué. De plus, il est intéressant de noter que 2 neurotoxines qui expérimentalement induisent l'ataxie (Durk et al., 1979) présentent une identité de structure primaire avec l'angiogénine (Baker et al., 1989; Rosenberg et al., 1989) et comme l'angiogénine sont des ribonucléases (Slifman et al., 1986). La localisation du gène de l'angiogénine sur le chromosome 14 présente donc, peut-être, un intérêt particulier pour la thérapeutique de cette maladie.

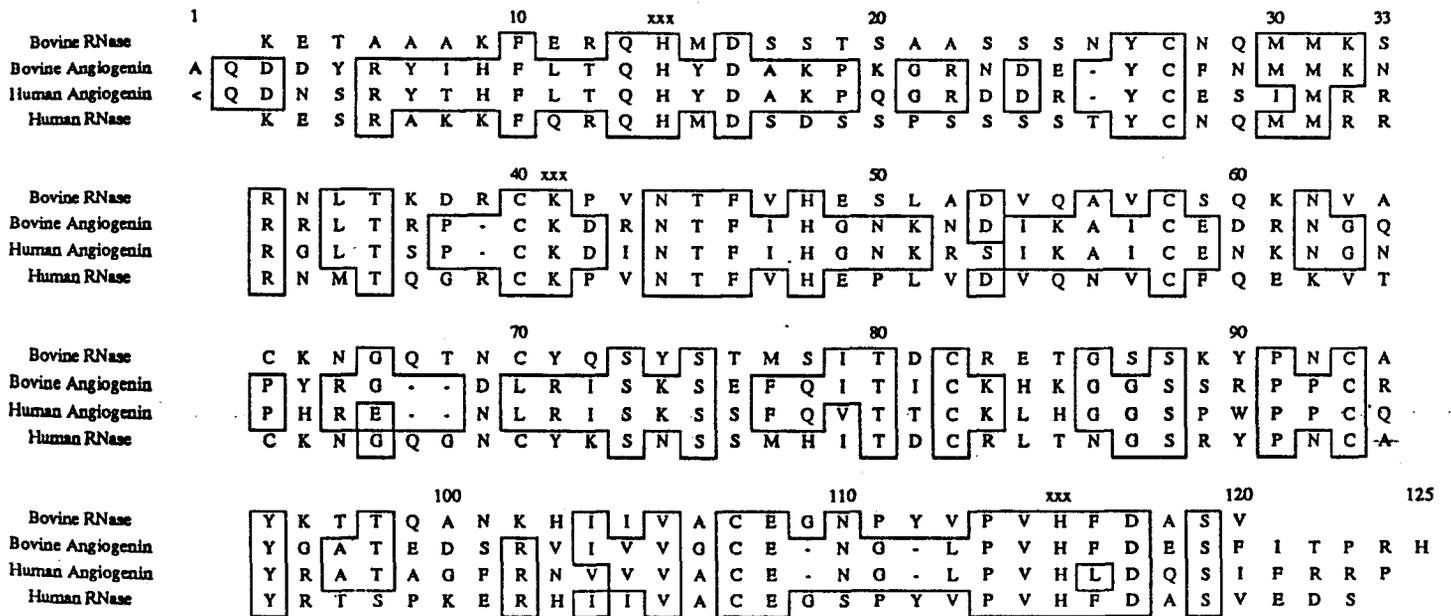
## B - PROPRIETES STRUCTURALES DE L'ANGIOGENINE

### 1 - Structure primaire

#### a - L'angiogénine humaine

L'angiogénine humaine est une protéine de 14.4 kDa, constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 123 acides aminés. La partie N-terminale de la molécule est bloquée, en effet, le premier acide aminé est l'acide pyroglutamique, la proline étant l'acide aminé C-terminal (Fett et al., 1985). Sa séquence en acides aminés a été entièrement déterminée (Fig.6, p47) par l'utilisation de méthodes chimiques de séquençage des protéines (Strydom et al., 1985).

Les ADNcs, ainsi que le gène codant pour l'angiogénine ont été isolés (Kurachi et al., 1985), leurs structures déterminées. Leurs séquences confirment la structure primaire précédemment décrite.



**Figure 6** : Comparaison des séquences en acides aminés de la ribonucléase pancréatique bovine, l'angiogénine bovine, l'angiogénine humaine et la ribonucléase pancréatique humaine (Maes *et al.*, 1988). La numérotation correspond à la séquence de l'angiogénine bovine. Les résidus communs sont entourés.

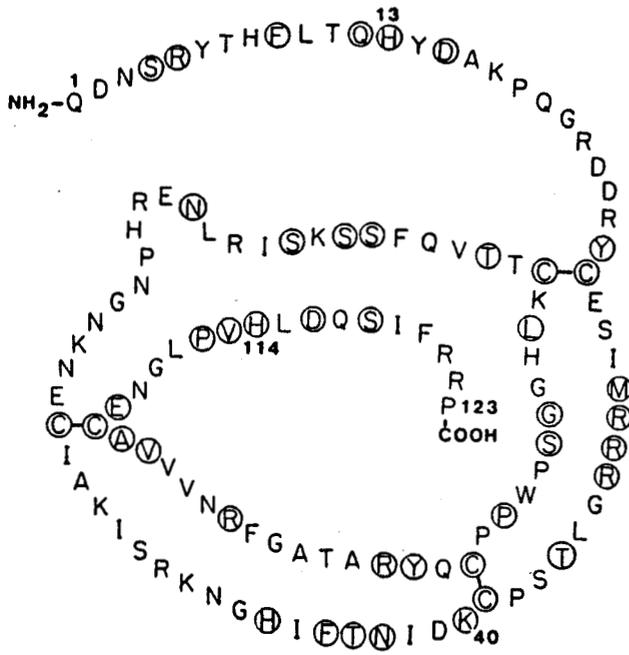
Comme le montre la figure 7 (p.49), l'angiogénine humaine présente 35 % d'homologie structurale avec la ribonucléase pancréatique humaine. Les acides aminés du site actif de la ribonucléase, notamment Gln-11, His-12, Lys-41, Thr-45, His-119 et Asp-121 (Wlodawer et al., 1982; Blackburn et Moore, 1982; Stern et Doscher, 1984; Beintema et al., 1984) sont conservés dans l'angiogénine (Gln-12, His-13, Lys-40, Thr-44, His-114 et Asp-116). De même, trois ponts disulfure parmi les quatre de la ribonucléase sont conservés, seul celui entre les résidus Cys-65 et Cys-72 de la RNase n'est pas présent dans l'angiogénine. Cependant, Sperling et al. (1969) ont montré que ce pont disulfure n'est pas indispensable à l'activité catalytique de la RNase A.

#### b - L'angiogénine bovine

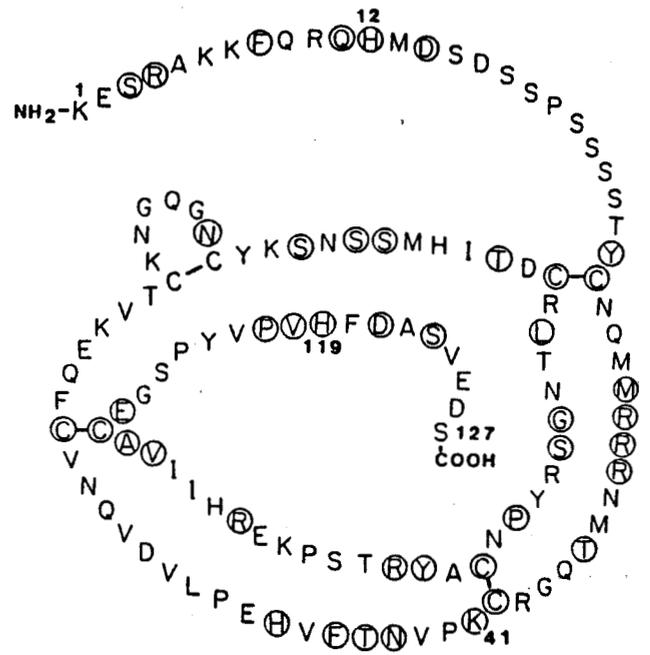
Au Laboratoire, l'angiogénine bovine a été isolée, sa séquence en acides aminés a été déterminée en collaboration avec le Laboratoire du Professeur Tartar (Maes et al., 1988).

Comme le montre la figure 6 (p.47) l'angiogénine bovine présente 65 % d'homologie structurale avec l'angiogénine humaine. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 125 acides aminés, de 14.5 kDa, les trois ponts disulfure de l'angiogénine bovine sont identiques à ceux de l'angiogénine humaine. L'homologie structurale avec la ribonucléase pancréatique A est conservée (34 %), notamment en ce qui concerne les acides aminés du site actif.

Comme le montre le tableau II (p.50), la plupart des acides aminés de la région du site actif de la RNase sont aussi présents dans les deux angiogénines, excepté la Gln-69. Une autre différence intéressante se situe en position 116 de l'angiogénine bovine, où se trouve un résidu de



Ribonucléase pancréatique



Angiogénine

**Figure 7 :** Comparaison des séquences en acides aminés de l'angiogénine humaine et de la ribonucléase pancréatique humaine (Strydom et al., 1985). Les acides aminés homologues sont cerclés.

**Tableau II** : Acides aminés impliqués dans le site actif de la RNase et leur correspondance avec ceux des angiogénines humaine et bovine (Maes et al., 1988).

Résidus RNase	Rôles proposés	Résidus angiogénine	
		humaine	bovine
His-12	élimine le proton 2'OH pont H avec le phosphate	His-13	His-13
His-119 Lys-41	apporte un proton 5'O stabilise l'intermédiaire pont H avec le 2'OH	His-114 Lys-40	His-115 Lys-41
Gln-11 Val-43 Asn-44 Thr-45	pont H du côté NH du phosphate	Gln-12 Ile-42 Asn-43 Thr-44	Gln-13 Arg-43 Asn-44 Thr-45
Gln-69 Asn-71 Glu-111 Phe-120 Asp-121 Ser-123	pont H entre NH et OH de pyrimidine O2 et N3 pont H du côté C-O de purine N ou O6 pont H du côté C-O de purine N ou O6 pont H de COO- à purine N1 pont H de amide NH au phosphate pont H de COO- à His-119 Im pont H de OH à uracil O4	délétion Asn-68 Glu-108 Leu-115 Asp-116 Ser-118	délétion Asp-69 Glu-109 Phe-116 Asp-117 Ser-119

phénylalanine, alors qu'à la même position, le résidu d'acide aminé de l'angiogénine humaine est la leucine. Or, il a été décrit par Lin et al. (1972) que la substitution Phé→Leu en position 120 de la RNase A (position Phe-116 sur l'angiogénine bovine et Leu-115 sur l'angiogénine humaine) se traduit par une diminution de son activité enzymatique. Cette différence pourra peut-être expliquer des différences d'activité entre l'angiogénine bovine et l'angiogénine humaine.

Trois acides aminés sont connus comme étant directement impliqués dans le processus catalytique de la RNase A: His-12, His-119 et Lys-41. La plupart des acides aminés entourant ces résidus sont également conservés dans les deux angiogénines, mais ils sont différents de ceux trouvés dans la RNase A. Ces différences expliquent peut-être l'activité ribonucléasique très particulière des angiogénines.

La différence majeure existante entre l'angiogénine bovine et les trois autres protéines (Fig.6, p.47) est la présence en position 67 d'une séquence Arg-Gly-Asp (Asp-Gly-Glu dans les ribonucléases). Cette séquence présente un intérêt particulier puisque des protéines telles que la fibronectine et le facteur Willebrand, parmi d'autres, possèdent cette séquence qui est reconnue par des récepteurs spécifiques: les intégrines. Ces récepteurs sont présents à la surface de nombreuses cellules, notamment dans les cellules endothéliales (Ruoslahti et Pierschbacher, 1986; Cheresh, 1987).

La séquence en acides aminés a également été réalisée pour l'angiogénine bovine isolée du plasma (Bond et Strydom, 1989), celle-ci est identique à celle de l'angiogénine isolée du lait.

### c - L'angiogénine murine

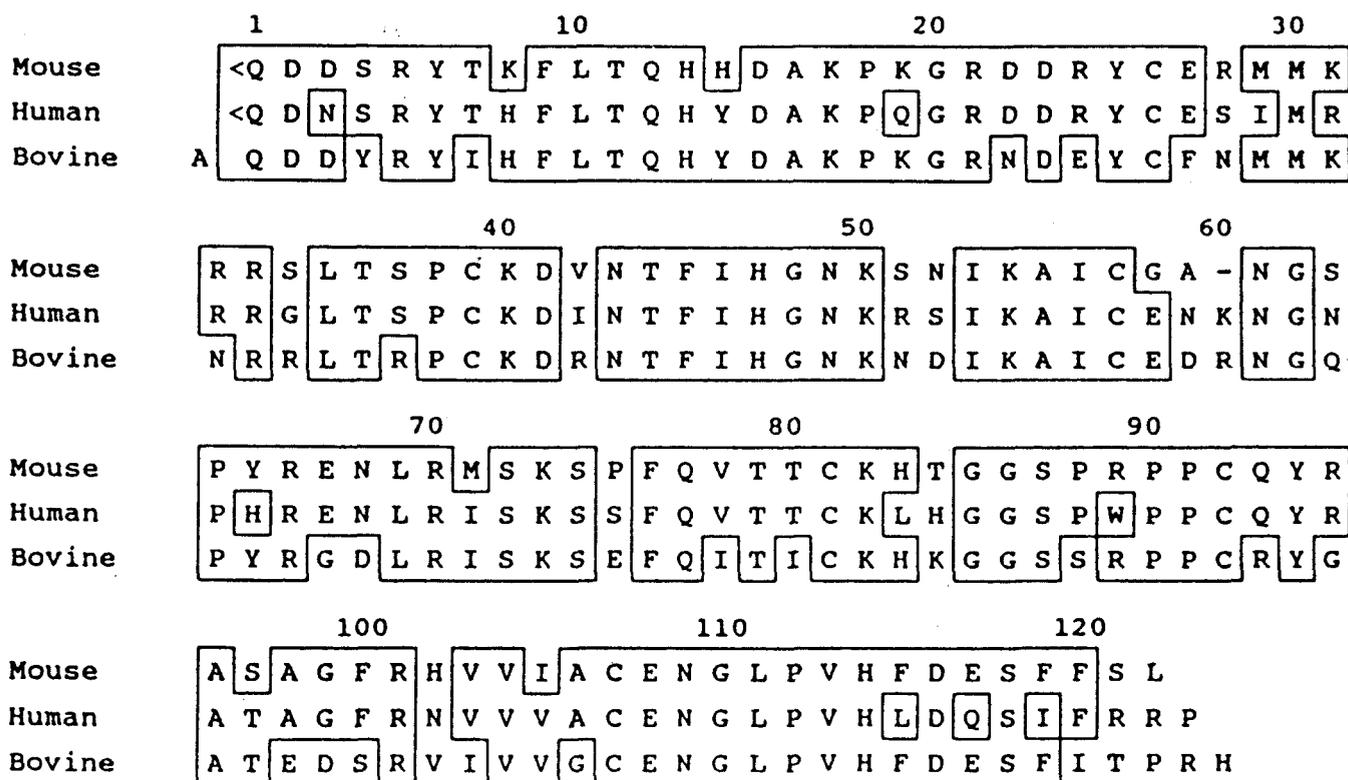
L'enchaînement des acides aminés de l'angiogénine du plasma de Souris a été déterminé par analyse de son ADNc (Bond et Vallee, 1990a). La masse moléculaire de l'angiogénine murine est de 15.5 kDa, elle est composée de 121 acides aminés. Sa séquence peptidique est donnée dans la figure 8 (p.53), nous pouvons constater qu'elle présente 76 % d'homologie avec celle de l'angiogénine humaine, l'acide pyroglutamique en position N-terminale est conservé comme dans l'angiogénine humaine. L'homologie structurale avec la ribonucléase pancréatique est conservée, notamment les acides aminés du site actif et les 6 résidus de cystéine nécessaires à la formation des ponts disulfure.

### d - Conclusion

L'homologie structurale entre les angiogénines murine et humaine est de 76 %, alors qu'elle est de 64 % seulement entre l'humaine et la bovine (Fig.8, p.53). Ces trois angiogénines possèdent 6 résidus de cystéine qui forment 3 ponts disulfure, les autres ribonucléases en possèdent 4 (Fig.7, p.49). Les trois angiogénines possèdent 35 % d'homologie avec la RNase pancréatique, cette homologie est significative en ce qui concerne certains résidus impliqués dans le site actif de la RNase comme l'His-12, l'His-119 et la Lys-41 (Tableau II, p.50).

## 2 - Structure tridimensionnelle

Sur la base de l'homologie structurale existant entre l'angiogénine et la ribonucléase, une première approche de la structure tridimensionnelle des angiogénines humaine et bovine a été réalisée par



**Figure 8** : Comparaison des séquences des angiogénines murine, humaine et bovine (Bond et Vallee, 1990a). La numérotation correspond à celle de l'angiogénine humaine; les résidus entourés sont conservés dans au moins deux angiogénines; Q: acide pyroglutamique.

ordinateur (Palmer et al, 1986; Tartar et al., communication personnelle). D'après les données obtenues par rayons X sur la structure de la ribonucléase, une structure géométrique simplifiée a d'abord été réalisée. Ensuite, par comparaison, une structure géométrique correspondante a été attribuée aux angiogénines, comme le montre la figure 9 (p.55).

Ce diagramme montrent que ces trois protéines ont une conformation identique en forme de haricot. Les acides aminés du site actif de la RNase A (His-12, His-119 et Lys-41) sont dans la même position pour l'angiogénine humaine (His-13, His-114 et Lys-40) et pour l'angiogénine bovine (His-13, His-115 et Lys-41).

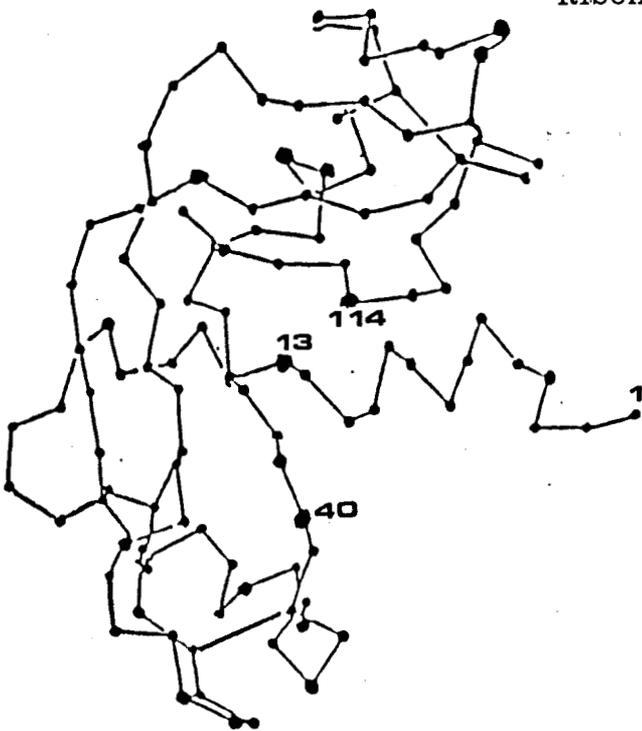
Ce diagramme montre aussi, que le tripeptide Arg-Gly-Asp de l'angiogénine bovine se trouve en position externe dans la protéine, donc en position accessible. Cette observation laisse supposer que cette séquence tripeptidique est impliquée dans la reconnaissance de l'angiogénine bovine par les cellules endothéliales.

L'homologie structurale entre les ribonucléases et les angiogénines a permis de déterminer certaines propriétés biologiques des angiogénines, en particulier, leur activité ribonucléasique.

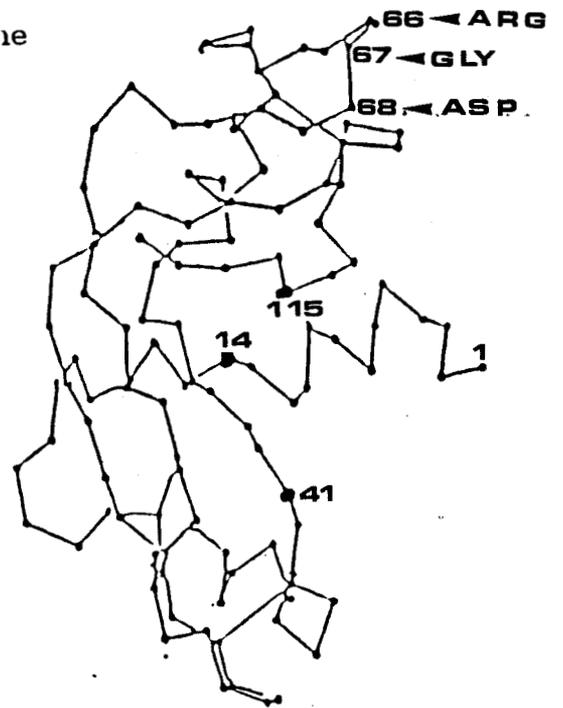


Ribonucléase pancréatique

humaine



Angiogénine humaine



Angiogénine bovine

**Figure 9** : Diagrammes représentant les conformations des angiogénines humaine et bovine et de la ribonucléase pancréatique humaine (Palmer et al., 1986; Tartar et al., communication personnelle).

## C - PROPRIETES BIOLOGIQUES DE L'ANGIOGENINE

### 1 - Activité angiogénique de l'angiogénine

#### a - L'angiogénine humaine

L'angiogénine humaine est douée d'activité angiogénique in vivo. Cette activité a été étudiée sur la CAM, ainsi que dans la cornée de Lapin (Fett et al., 1985). L'évaluation statistique sur la CAM montre que de très faibles quantités de cette protéine suffisent à l'expression de cette activité, puisque seulement 35 fmoles par oeuf induisent la formation de néovaisseaux. De même, seulement 3.5 pmoles stimulent l'angiogénèse dans la cornée de Lapin.

Cette activité angiogénique a été comparée à celle du bFGF bovin sur la CAM (Fett et al., 1987). La réponse angiogénique obtenue avec un mélange de ces deux facteurs, montre que les deux activités ne s'additionnent pas. Aucun phénomène de synergie n'est observé.

#### b - L'angiogénine bovine

L'activité angiogénique de l'angiogénine bovine isolée du lait de Vache a été vérifiée in vivo pour des doses allant de 5 à 50 ng. Actuellement, la quantité minimale induisant l'angiogénèse est de 3.5 pmoles d'angiogénine de lait de Vache, par oeuf (Damart, 1989).

Cependant, du fait de l'imprécision inhérente aux expérimentations utilisées, il n'était pas possible à cette époque de conclure que l'angiogénine bovine est moins active que son analogue d'origine humaine.

Bond et Vallee (1988) ont décrit que 44 fmoles d'angiogénine du plasma de Boeuf sont nécessaires pour induire la néovascularisation sur la CAM.

## 2 - Activité ribonucléasique de l'angiogénine

La conservation dans l'angiogénine humaine des acides aminés impliqués dans l'activité de la RNase A (His-12, His-119, Lys-41), suggère une éventuelle activité ribonucléasique de cette protéine. Cette activité a effectivement été démontrée pour l'angiogénine humaine par Shapiro et al. (1986).

Pour déterminer l'activité ribonucléasique, les auteurs ont utilisé divers substrats: ARNs, polyribonucléotides, dinucléotides et nucléotides cycliques. Les résultats ont montré que l'angiogénine humaine possède une activité ribonucléasique hautement spécifique, elle catalyse uniquement le clivage des ARNs ribosomiques 18 et 28 S. Les produits majeurs ainsi formés sont des fragments de 100 à 500 nucléotides.

Rybak et Vallee (1988) ont également étudié l'activité envers les ARNs ribosomiques 5 S de Saccharomyces cerevisiae et d'Escherichia coli. Ils ont montré que l'angiogénine humaine hydrolyse les liaisons phosphodiester des résidus de cytidine et d'uridine préférentiellement quand ceux-ci sont suivis d'un résidu d'adénine. Cependant, tous les sites de coupure potentiels ne sont pas hydrolysés, ce qui pourrait impliquer que la structure secondaire, voire tertiaire de ces ARNs intervient dans le mécanisme de reconnaissance par l'angiogénine.

Plus récemment, Lee et Vallee (1989a) ont montré que le ARNt de levure est aussi un substrat pour l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine.

Cette activité catalytique a été retrouvée pour l'angiogénine bovine, qu'elle soit isolée du lait (Maes et al., 1988) ou du plasma (Bond et Vallee, 1988).

L'angiogénine est donc un membre de la superfamille des ribonucléases qui à l'heure actuelle inclue environ 40 protéines (Beintema, 1987). Récemment, D'Alessio et al. (1991) ont proposé la dénomination de "RISBASES" pour caractériser un groupe particulier de cette famille, c'est à dire les ribonucléases possédant une activité biologique particulière, non catalytique. Les différents membres de la famille des RISBASES, dont l'angiogénine, sont présentés dans le tableau III (p.59).

Les futures études sur la structure et les fonctions biologiques des RISBASES seront très importantes pour déterminer leur rôle physiologique, notamment lors de certains évènements tels que l'organogenèse, le cancer ou encore l'immunomodulation.

### 3 - Inhibition des activités ribonucléasique et angiogénique de l'angiogénine

L'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine est inhibée par une protéine monocaténaire acide d'environ 51 kDa qui fut isolée du placenta humain par Blackburn et al. en 1977. Cet inhibiteur forme avec

**Tableau III : Les RISBASES: Ribonucléases possédant une activité biologique particulière non enzymatique (D'Alessio et al., 1991).**

RISBASE	Source	Actions biologiques
<b>Animal</b> BS-RNase	vésicules séminales bovines	anti-fertilité anti-tumorale immunosuppresseur
Angiogénine	plasma humain	angiogénique inactivation des ribosomes
EDN	foie humain éosinophiles humains	neurotoxique
ECP	éosinophiles humains	anti-helminthique neurotoxique
RNase	oeufs de grenouille	lectine
<b>Végétal</b> S-gène produits	<i>Nicotiana glauca</i> style	incompatibilité gamétophytique
a-Sarcin	<i>Aspergillus giganteus</i>	inactivation des ribosomes

la ribonucléase et l'angiogénine un complexe très stable (Shapiro et Vallee, 1987; Bond, 1988).

L'inhibiteur placentaire des ribonucléases (PRI) est capable d'inhiber à la fois les activités ribonucléasique et angiogénique de l'angiogénine humaine (Shapiro et Vallee, 1987; Lee et Vallee, 1989b; Lee et al., 1989a). Le complexe angiogénine-PRI est stable, comme pour la RNase A, le parahydroxymercuribenzoate employé à une concentration millimolaire est capable de dissocier le complexe et ainsi de restituer les activités biologiques de l'angiogénine.

Des expériences de compétition entre l'angiogénine humaine et la RNase A vis-à-vis du PRI ont montré que l'interaction entre l'angiogénine et le PRI est très forte, la constante de dissociation du complexe étant inférieure à 0.1 nM. De ce fait, certains auteurs (Schneider et al., 1988) préfèrent utiliser le nom d'inhibiteur de ribonucléase et d'angiogénine (RIA) que celui de PRI. En effet, il se pourrait que cet inhibiteur soit, en fait, l'agent régulateur de l'angiogénèse provoquée par l'angiogénine. Cette hypothèse a été vérifiée (Lee et al., 1989b) puisqu'il apparaît que l'affinité du PRI pour l'angiogénine est environ 60 fois plus importante que celle liant le PRI à la ribonucléase.

De la même façon que pour l'angiogénine humaine, les angiogénines du lait de Vache (Damart, 1989) et du plasma de Vache (Bond et Vallee, 1988) se fixent au PRI et voient ainsi leurs activités biologiques inhibées.

#### 4 - Inhibition de la synthèse protéique

##### a - L'angiogénine humaine

Des lysats de réticulocytes de Lapin ont été utilisés comme système de traduction in vitro pour apprécier l'effet de l'angiogénine humaine sur la synthèse des protéines (St Clair et al., 1987,1988).

L'inhibition de la synthèse de protéines provoquée par l'angiogénine humaine est proportionnelle à sa concentration et devient totale pour des molarités de 40 à 60 nM tandis que l'inhibition par la RNase A dans les mêmes conditions n'est que de 50 %.

Le traitement préalable de l'angiogénine humaine par le PRI empêche totalement la capacité d'inhiber la synthèse protéique. Ceci démontre donc que cette activité de l'angiogénine humaine est liée à son activité ribonucléasique.

##### b - L'angiogénine bovine

Les résultats obtenus au Laboratoire (Damart, 1989) sur l'inhibition de la synthèse des protéines par l'angiogénine bovine sont en contradiction avec ceux de St Clair et al. (1987). En effet, les inhibitions de la synthèse obtenues par Damart (1989) avec l'angiogénine bovine sont du même ordre de grandeur que ceux obtenus avec la RNase A. Bond et Vallee (1988) montrent cependant, que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine isolée du plasma bovin sur les ARN 18 et 28 S est approximativement 3 fois plus faible que celle de l'angiogénine humaine. De ce fait, il paraît logique que l'inhibition de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine bovine soit également

plus faible. Ces résultats remettent donc en question la spécificité du blocage de la synthèse protéique provoquée par l'angiogénine.

## 5 - Activité de l'angiogénine vis-à-vis des cellules en culture

### a - Activation de la phospholipase C

Bicknell et Vallee (1988) ont démontré que l'angiogénine humaine stimule des changements dans les concentrations intracellulaires des seconds messagers, en augmentant l'activité de la phospholipase C spécifique de l'inositol dans les cultures de cellules endothéliales d'artère pulmonaire, de veine ombilicale et de capillaires.

Cet effet est proportionnel à la concentration en angiogénine, et se traduit dans la cellule par une augmentation appréciable du taux de 1,2-diacylglycérol, un activateur putatif de la protéine kinase C, ainsi que de l'inositol triphosphate. La réponse maximale est obtenue pour une concentration en angiogénine de 1 ng/ml dans les cultures de cellules endothéliales d'artères et de capillaires. Pour les cellules endothéliales de veine ombilicale, des concentrations plus importantes en angiogénine sont nécessaires, ces concentrations sont comparables à la concentration existante dans le plasma de sujets sains.

Lorsque le site actif de l'angiogénine est modifié, ou lorsque le PRI inhibe l'angiogénine, il y a perte de cette activité de la même façon qu'il y a perte de ses activités ribonucléasique et angiogénique.

Les auteurs avancent l'idée de l'existence d'un récepteur cellulaire de surface ou d'autres mécanismes permettant de limiter cette activité in vivo. En effet, les cellules endothéliales, in vivo, sont exposées de façon permanente à des concentrations en angiogénine beaucoup plus importantes que celles requises pour obtenir une réponse cellulaire.

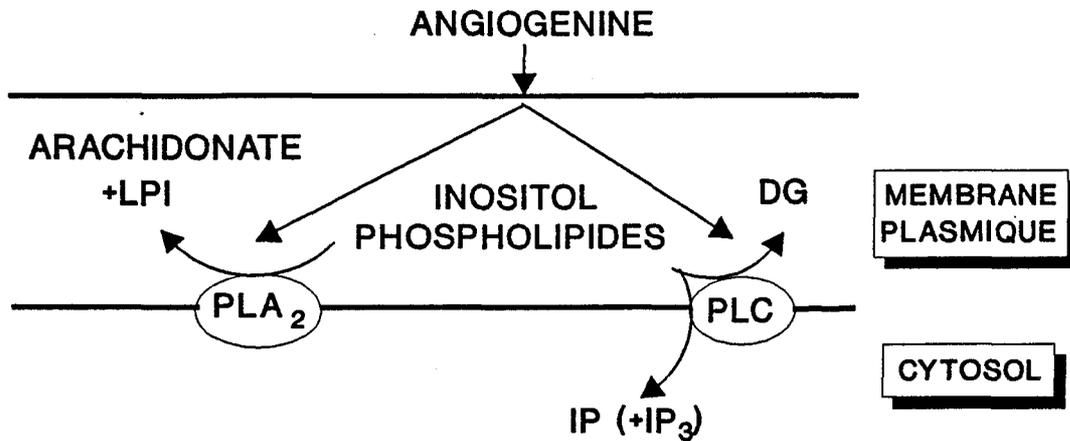
Plus récemment, l'activation de la phospholipase C par l'angiogénine a été mise en évidence dans les cellules musculaires lisses d'aorte de Rat (Moore et Riordan, 1990).

b - Stimulation de la sécrétion de prostacycline  
par activation de la phospholipase A<sub>2</sub>

Plus récemment, Bicknell et Vallee (1989) ont montré que l'angiogénine humaine stimule la sécrétion de prostacycline dans les cellules endothéliales de capillaires et de la veine ombilicale. La concentration en angiogénine requise pour cette stimulation est similaire à celle requise pour l'activation de la phospholipase C, soit 1 à 10 ng/ml.

Les auteurs (Bicknell et Vallee, 1989) ont également montré que cette stimulation est bloquée par des inhibiteurs de la synthèse de prostacycline, par l'inhibiteur spécifique de la phospholipase A<sub>2</sub>: la quinacrine, ainsi que par l'inhibiteur H<sub>7</sub> des protéines kinases.

Ainsi, le mécanisme d'action de l'angiogénine (Fig.10, p.64) vis-à-vis des cellules endothéliales, que ces mêmes auteurs avaient décrit précédemment (Bicknell et Vallee, 1988), semble être vérifié: l'angiogénine humaine active la phospholipase C et la phospholipase A<sub>2</sub>. Donc, l'angiogénine circulante pourrait avoir un rôle in vivo dans la



**Figure 10** : Mode d'action de l'angiogénine vis-à-vis des cellules endothéliales, proposé par Bicknell et Vallee (1988). LPI: lysophosphatidyl inositol; DG: diacylglycérol; PLA<sub>2</sub>: phospholipase A<sub>2</sub>; PLC: phospholipase C; IP: inositol phosphate; IP<sub>3</sub>: inositol triphosphate.

sécrétion de prostacycline par l'endothélium. La prostacycline paraît, elle jouer un rôle dans la protection des vaisseaux contre le dépôt des plaquettes agrégées (Dusting et al., 1982).

### c - Modulation de stimuli mitogènes

L'angiogénine humaine semble ne pas être mitogène pour les cellules endothéliales de capillaires, les cellules musculaires lisses ou encore pour les fibroblastes, mais elle peut moduler leur réponse aux stimuli mitogènes (Heath et al., 1989).

Heath et al. (1989) ont étudié l'effet de l'angiogénine sur ces différentes cellules par l'intermédiaire de milieux de culture d'autres types cellulaires, comme signal mitogène. Ainsi, quand les cellules de muscle lisse ou les fibroblastes sont les cellules cibles, l'angiogénine augmente la réponse mitogène alors qu'elle inhibe cette réponse dans les cellules endothéliales. De plus, le traitement, in vitro, des membranes plasmiques de ces cellules par l'angiogénine entraîne une activation de nombreuses enzymes présentes dans ces membranes, lesquelles vont convertir l'arachidonate et le lysophosphatidylinositol en phosphatidylinositolbiphosphate (PtdInsP<sub>2</sub>). Le PtdInsP<sub>2</sub> joue un rôle important dans le signal intracellulaire de nombreux mitogènes.

Les différentes interactions de l'angiogénine avec diverses cellules reflètent peut-être les différentes étapes de la vascularisation. Les auteurs (Heath et al., 1989) en ont conclu qu'il est possible que l'angiogénine rende quiescentes les cellules endothéliales, et stimule indirectement la croissance d'autres types cellulaires tel que les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. L'angiogénine agirait donc

suivant le même scénario que le TGF- $\beta$  lors de la vascularisation in vivo.

#### d - Fixation sur les cellules

Pour la première fois en 1989, Badet et coll. ont mis en évidence une fixation spécifique de l'angiogénine humaine sur les cellules endothéliales en culture, ceci par étude de la fixation directe de l'angiogénine marquée à l'iode-125.

Selon ces auteurs, l'angiogénine se fixe sur différentes cellules endothéliales: les cellules endothéliales d'artère pulmonaire de Boeuf, de capillaires et d'aorte de Boeuf, aussi bien que sur la matrice extracellulaire.

L'analyse de cette fixation par Scatchard montre une constante de dissociation apparente de  $5 \times 10^{-9}$  M, donc des sites de haute affinité, ainsi que des sites de faible affinité ( $2 \times 10^{-6}$  M).

Ces auteurs montrent également que le PRI joue un rôle physiologique important dans le contrôle des fonctions de l'angiogénine, en effet, le PRI diminue la fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules endothéliales.

### D - RELATION STRUCTURE ET ACTIVITE BIOLOGIQUE DE L'ANGIOGENINE

L'angiogénine et la RNase A possèdent une importante homologie structurale, l'angiogénine possède une activité ribonucléasique très spécifique mais la RNase A ne possède aucune activité angiogénique. De nombreuses approches ont été réalisées pour déterminer les régions

structurales de l'angiogénine impliquées dans les activités enzymatique et angiogénique.

### 1 - Activité de molécules hybrides: RNase A / Angiogénine

Dans une étude préliminaire, Shapiro et al. (1987b) ont démontré que des réactifs spécifiques de l'histidine, de la lysine et de l'arginine diminuaient l'activité ribonucléasique de l'angiogénine humaine beaucoup plus que celle de la RNase A. Ceci suggérait que ces trois acides aminés étaient impliqués dans le mécanisme d'action de l'angiogénine humaine.

En 1988, Harper et al. se fondant sur les travaux de Richards et al. (1958, 1959) ont réalisé des molécules hybrides en réassociant des fragments de RNase A et d'angiogénine humaine.

En effet, les fragments N- et C-terminaux préparés à partir de la RNase A ont la capacité de se combiner de façon non covalente et ainsi de régénérer l'activité catalytique.

Deux types d'hybrides ont été réalisés: le premier, en réassociant le peptide correspondant aux résidus d'acides aminés 1-21 de l'angiogénine humaine avec le peptide C-terminal de la RNase A (21-124, protéine S), le second par combinaison des acides aminés 1-118 de la RNase A aux résidus 108-123 de l'angiogénine humaine.

Les auteurs ont ensuite recherché les activités catalytiques de ces molécules hybrides et les ont comparées à celles de la RNase A. Les expériences ont ainsi montré que les acides aminés: Leu-115, His-13 et His-114 sont impliqués dans la spécificité de l'activité ribonucléasique de l'angiogénine.

En 1990b, Bond et Vallee ont réalisé par mutagenèse d'autres hybrides RNase A / Angiogénine. La région 8-21 de l'angiogénine humaine est très conservée dans les autres angiogénines, alors qu'elle diffère beaucoup de celle de la RNase A. Cette région 8-21 a donc été remplacée dans l'angiogénine par la séquence 7-21 correspondant à celle de la RNase A.

L'activité ribonucléasique de cet hybride est inchangée, par contre, la capacité d'inhibition de la synthèse de protéine est diminuée par rapport à l'angiogénine native. L'activité angiogénique de cet hybride est également différente, puisque seulement une quantité de 0,1 ng d'hybride par oeuf suffisent pour obtenir une réponse maximale sur la CAM, soit 10 fois moins que l'angiogénine native. Par ailleurs, la fixation de cet hybride sur le PRI est elle aussi augmentée.

La mutation de cette région (8-21) hautement conservée dans l'angiogénine, modifie les propriétés biologiques de celle-ci, elle ne modifie cependant pas ses propriétés enzymatiques. Cette région de l'angiogénine est peut-être impliquée dans l'interaction de l'angiogénine avec des ligands spécifiques, des récepteurs ou encore des substrats.

## 2 - Sensibilité de l'angiogénine vis-à-vis des protéases

La structure primaire de l'angiogénine possède 33 % d'homologie avec celle de la RNase A, mais les activités enzymatiques de ces deux protéines sont très différentes. Leur susceptibilité envers l'action de différentes enzymes sont également très différentes.

Les sites de protéolyse de ces deux protéines ont été étudiés par Harper et Vallee (1988a). L'activité de 16 protéases a été étudiée vis-à-vis de l'angiogénine, les résultats ont montré que seulement

l'endoprotéase Lys-C, la trypsine et la pepsine sont capables de couper l'angiogénine (Fig.11, p.70).

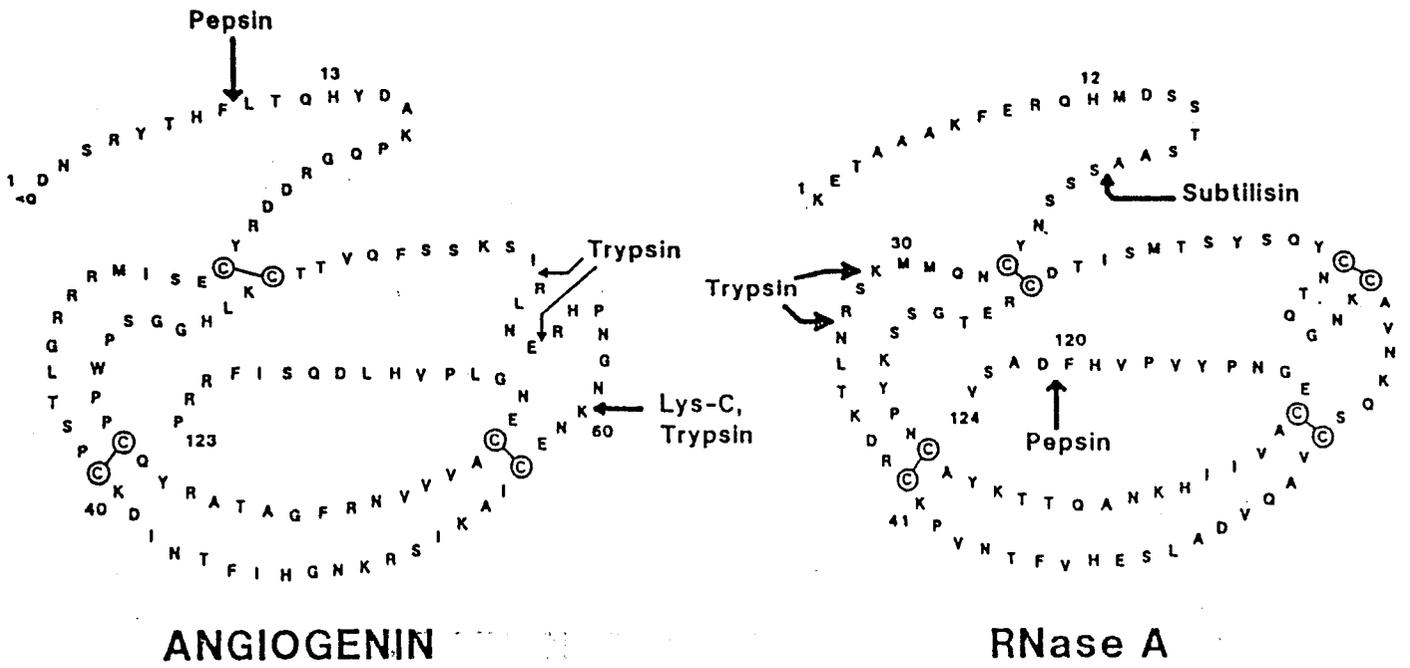
La subtilisine BPN' est totalement inactive envers l'angiogénine alors qu'elle coupe facilement la RNase (Ala-20-Ser-21), pour donner le RNase S (Richards et Vithayathil, 1959). Ce clivage est dû à la structure secondaire particulière du peptide S adjacent à la séquence Ser-Ser-Ser, absente dans l'angiogénine.

A pH 2, la pepsine agit rapidement sur les deux protéines mais le site de clivage est différent. Le peptide (10-23) de l'angiogénine ainsi obtenue conserve 15 % de l'activité ribonucléasique de la protéine native, les résidus 1-9 ne sont donc pas indispensables pour cette activité.

La trypsine et l'endoprotéase Lys-C coupent rapidement l'angiogénine, sans modifier l'activité de celle-ci. Le même point de coupure est présent dans la RNase, pourtant dans les mêmes conditions, cette dernière n'est pas coupée à ce point. La trypsine n'est capable d'agir sur la RNase qu'à haute température (60°C), les sites de coupure étant alors très différents de ceux de l'angiogénine.

Si l'on se réfère aux études de Palmer et al. (1986), la région 58-70 de l'angiogénine possède une structure en boucle, structure également présente chez la RNase mais stabilisée par un pont disulfure. De plus, les séquences des deux protéines sont très différentes dans cette région. Cette région en forme de boucle est peut-être très importante pour l'activité de l'angiogénine.

Beaucoup plus récemment, Hallahan et al. (1991) ont réussi à dissocier les deux activités de l'angiogénine par protéolyse spécifique entre la Lys-60 et l'Asn-61 (Angiogénine K) soit entre la Glu-67 et



**Figure 11** : Site de coupure protéolytique de l'angiogénine humaine et de la RNase A bovine (Harper et Vallee, 1988a). Les positions de coupure sont indiquées par les flèches.

l'Asn-68 (Angiogénine E). Ces deux angiogénines conservent les activités enzymatiques de l'angiogénine native, mais elles ont perdues leur propriété angiogénique et ne possèdent aucune activité envers les cellules endothéliales. Cependant, les angiogénines E et k sont incapables d'entrer en compétition avec l'angiogénine native lors des essais d'angiogénèse. Ces résultats obtenus par Hallahan et al. (1991) montrent que la région incluant les résidus 60 à 68 joue un rôle important dans la fixation de l'angiogénine sur son récepteur, cette région étant indépendante de celle du site actif.

### 3 - Rôle de l'acide aspartique 116 de l'angiogénine

L'Asp-121 est conservé dans toutes les RNases pancréatiques connues (Blackburn et Moore, 1982). Dans la structure cristallographique de la RNase, l'Asp-121 forme un pont hydrogène avec l'His-119, événement indispensable à l'activité catalytique de la RNase (Wlodawer et al., 1988).

Dans l'angiogénine, cet Asp-121 correspond à l'Asp-116. Harper et Vallee (1988b) ont étudié le remplacement, par mutagenèse dirigée, de cet Asp-116 par un résidu d'asparagine, d'alanine ou d'histidine. Les mutants angiogénines ainsi obtenus, voient leur activité ribonucléasique et angiogénique augmentées toutes les deux. Ces résultats montrent que les activités ribonucléasique et angiogénique de l'angiogénine sont interdépendantes.

### 4 - Rôle des His-13 et His-114 de l'angiogénine

L'angiogénine est inactivée par le bromoacétate, cette inactivation est due à la carboxyméthylation des His-13 et His-114 (Shapiro et al.,

1988b). Après 4 h de réaction, les modifications apparaissent exclusivement sur le N-3 de l'His-13 et le N-1 de l'His-114, dans les proportions 2:3 respectivement, contrairement à 1:8 pour la RNase A. Cette différence de réactivité entraîne une inactivation de l'angiogénine 5 fois moins importante que celle de la RNase A (Shapiro et al., 1987b). Le degré d'inactivation de l'angiogénine est plus élevé quand les modifications des His-13 et His-114 sont réalisées séparément. Ces résultats montrent que les deux acides aminés: His-13 et His-114 doivent jouer un rôle primordial dans l'activité de l'angiogénine.

Shapiro et Vallee (1989) ont par la suite, étudié le rôle de ces deux histidines après les avoir modifiées par mutagenèse dirigée. Le remplacement des His-13 et His-114 par des résidus alanine diminue de 10.000 fois l'activité ribonucléasique de l'angiogénine et entraîne une perte totale de son activité angiogénique. Ces résultats montrent également que l'activité biologique de l'angiogénine est dépendante de l'intégrité de son site actif.

##### 5 - Rôle des ponts disulfure de l'angiogénine

L'angiogénine possède 3 des 4 ponts disulfure de la RNase, le pont disulfure Cys-65-Cys-72 est absent dans l'angiogénine. Harper et Vallee (1989) ont réalisé par mutagenèse dirigée un hybride de l'angiogénine où cette région a été remplacée par la séquence correspondante de la RNase, qui exprimée chez Escherichia coli présente les 4 ponts disulfure de la RNase. Les études de l'activité de ces mutants montrent qu'alors l'activité angiogénique de l'angiogénine est diminuée alors que son activité enzymatique est augmentée. Les

différences d'activité entre la RNase et l'angiogénine ne sont pas associées à une seule région de la protéine.

#### 6 - Rôle des lysines de l'angiogénine

En 1987, Shapiro et al. ont montré que la modification chimique des lysines de l'angiogénine entraîné une diminution de son activité ribonucléasique.

Shapiro et al. (1989) ont montré, après modification chimique limitée, que les Lys-50 et Lys-82 de l'angiogénine ne sont pas indispensables à son activité enzymatique, alors que la Lys-60 joue peut-être un rôle. Par ailleurs, ces auteurs ont remplacé, par mutagenèse dirigée, la Lys-40 (correspondant à la Lys-41 du site actif de la RNase A) de l'angiogénine. Les résultats montrent que le dérivé Gln-40 possède une activité angiogénique diminuée par rapport à la protéine native. Ces observations montrent que l'activité angiogénique de l'angiogénine est dépendante de l'intégrité de son site actif enzymatique.

D'autres expériences (Harper et al., 1990) de remplacement par mutagenèse dirigée du résidu Lys-40 de l'angiogénine, ont par la suite confirmé ces résultats. La modification de la Lys-40 entraîne une augmentation de l'activité enzymatique et une diminution de l'activité biologique de l'angiogénine sur la CAM.

#### 7 - Importance de la région C-terminale de l'angiogénine

Rybak et al. (1989) ont synthétisé des peptides correspondants à la région C-terminale de l'angiogénine. Ces peptides inhibent les activités

enzymatique et biologique de l'angiogénine native, alors que des peptides correspondants à la région N-terminale sont incapables d'entrer en compétition avec l'angiogénine native.

En particulier, le peptide angiogénine 108-121 empêche l'inhibition la synthèse de protéine par l'angiogénine native. Ce même peptide diminue significativement la capacité de l'angiogénine à induire la néovascularisation dans la CAM.

La région C-terminale de l'angiogénine est donc indispensable à son activité enzymatique comme à ses activités biologiques.

#### 8 - Localisation du site de fixation du PRI sur l'angiogénine

Lee et al. (1989b) ont montré par des techniques de fluorescence, que le Trp-89 de l'angiogénine devait jouer un rôle lors du contact de l'angiogénine avec le PRI.

Par la suite, Lee et Vallee (1989b) ont montré que l'oxydation de ce Trp-89 entraînait une dissociation plus rapide du complexe angiogénine-PRI. Par ailleurs, l'ensemble des études de l'interaction de différents dérivés de l'angiogénine, a permis à ces auteurs de déterminer que 4 résidus de l'angiogénine sont indispensables à la fixation du PRI: Lys-40, His-13, His-114 et Trp-89. Ces résultats montrent que le PRI se fixe sur le site actif de l'angiogénine.

#### 9 - Conclusion

Des expériences d'hybridation, de mutation (Harper et Vallee, 1988,1989; Shapiro et al., 1988a,b; Rybak et al., 1989; Bond et Vallee, 1990b; Harper et al., 1990), montrent que les différences d'activité entre l'angiogénine et la RNase A ne sont pas associées à un seul acide

aminé ni même à une seule région de la protéine. Ces expériences ont également permis de montrer que certaines modifications de la protéine vont inhiber ou activer les deux activités biologiques. Par exemple, le site actif, indispensable à l'activité ribonucléasique, doit être aussi intact pour qu'il y ait angiogenèse (Shapiro et al., 1989; Shapiro et Vallee, 1989). Ou encore, des mutations aboutissant à l'augmentation de l'activité catalytique de l'angiogénine entraînent une augmentation du pouvoir angiogénique de celle-ci (Harper et Vallee, 1988). Ces deux activités de l'angiogénine sont donc bien interdépendantes.

#### E - CONCLUSION

L'angiogénine est un facteur d'angiogenèse sécrété, synthétisé par les tissus sains et tumoraux. In vivo, le potentiel angiogénique de l'angiogénine est important. Quand nous avons commencé notre travail, aucune activité de l'angiogénine n'avait été démontrée vis-à-vis de la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ou de tout autre mécanisme physiologique associé à l'angiogenèse in vitro.

Dans la littérature l'angiogénine est décrite comme un facteur non mitogène. Ses effets angiogéniques in vivo sont alors expliqués par une action sur la différenciation des cellules endothéliales, ou par le recrutement d'autres cellules susceptibles de produire d'autres facteurs angiogéniques.

Son activité ribonucléasique spécifique des ARN 18 et 28 S et son activité angiogénique apparaissent être interdépendantes. Les acides aminés (His-13, His-114, Lys-40) indispensables à l'activité ribonucléasique sont également indispensables à son activité angiogénique. Cette relation peut suggérer que in vivo, les ARNs sont

une cible pour l'angiogénine, laissant ainsi apparaître une activité intracellulaire de l'angiogénine.

Des études récentes ont montré que l'angiogénine stimule la phospholipase C intracellulaire, ainsi que la sécrétion de prostacycline dans les cellules endothéliales en culture (Bicknell et Vallee, 1988; Moore et Riordan, 1990). Ces activités de l'angiogénine sur les cellules suggèrent l'existence d'un récepteur membranaire spécifique. Ce récepteur a été mis en évidence, par la suite, sur différentes cellules endothéliales (Badet et al., 1989).

L'existence de ce récepteur est également confirmé par le fait que certains mutants de l'angiogénine dépourvus d'activité enzymatique sont encore capables d'inhiber l'activité angiogénique de celle-ci (Shapiro et Vallee, 1989). Le site de fixation du récepteur serait donc distinct du site catalytique de l'angiogénine.

Ces résultats laissent penser qu'après fixation sur son récepteur, l'angiogénine est internalisée et qu'elle induit une réponse cellulaire par son activité ribonucléasique. Si l'angiogénine n'est pas internalisée, nous pouvons alors penser que sa fixation sur son récepteur entraînerait simplement une augmentation de son activité envers certains substrats solubles.

L'angiogénine du lait de Vache a été isolée au Laboratoire. La première partie de nos travaux, présentés dans la suite de ce mémoire, porte sur la purification et la caractérisation de cette protéine.

Nous nous sommes ensuite intéressée aux propriétés biologiques de l'angiogénine du lait de Vache. Nous avons tout d'abord déterminé son

activité angiogénique in vivo sur la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet.

Enfin, comme nous l'avons mentionné auparavant, la ou les activités de l'angiogénine vis-à-vis d'un ou des mécanismes physiologiques associés à l'angiogenèse n'ont à l'heure actuelle pas encore été déterminées. Nous avons recherché ces éventuelles activités de l'angiogénine, cette étude a été réalisée sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf, ainsi que sur les cellules endothéliales d'aorte de Boeuf.

**MATERIELS  
ET  
METHODES**

# I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE

## A - MATERIELS

La purification de l'angiogénine a été réalisée à partir de lait de Vache stabilisé frais (provenant de la traite du jour), délipidé par écrémage à la ferme.

## B - TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

### 1 - Chromatographie de "Batch-adsorption"

20 l de lait de Vache écrémé sont mis en contact avec 50 g de SP-Séphadex C-25 (Pharmacia), pendant 12 h à 4°C, sous agitation douce grâce à une hélice. Après ces 12 h de contact, les protéines basiques sont fixées sur l'échangeur de cations. Le gel SP-Séphadex est ensuite recueilli par filtration sur Büchner recouvert d'un filtre de soie "Monodur" (Tripette et Renaud, 100% Nylon Blutex T n°60). Ces 400 ml de gel sont alors rincés abondamment à l'eau distillée (au minimum 20 l d'eau sont nécessaires), puis montés en colonne (7x30 cm). L'élution des protéines basiques réalisée à 500 ml/h, se fait par des tampons de concentrations croissantes en acétate de sodium: 0,2 M, 0,6 M et 2M.

### 2 - Chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast Flow

La fraction éluee par l'acétate de sodium 0,6 M obtenue après chromatographie de "Batch-adsorption" est diluée avec de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration finale de 0,2 M en acétate de sodium.

Cette fraction est alors injectée sur une colonne de S-Sépharose Fast Flow (5x20 cm, Pharmacia), équilibrée dans l'acétate de sodium 0,2 M. Le débit est de 1 l/h, la chromatographie est réalisée à 4°C.

Après lavage de la colonne (1 l d'acétate de sodium 0,2 M), trois fractions sont éluées successivement par des solutions d'acétate de sodium de concentrations croissantes: 0,4 M, 0,6 M et 1,5 M. Chaque fraction est alors dialysée contre de l'eau distillée, à 4°C, puis lyophilisée.

### 3 - Chromatographie sur colonne Mono-S en système FPLC

La colonne Mono-S HR 10/10 constituée d'un gel échangeur de cations est utilisée en système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia).

15 mg de la fraction 0,6 M obtenue après chromatographie sur S-Sépharose Fast Flow, sont dilués dans 500  $\mu$ l de tampon phosphate 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7 (PBS) puis injectés sur la colonne Mono-S équilibrée dans le même tampon.

L'éluion des différentes fractions est réalisée par un gradient par paliers d'un tampon PBS, NaCl 1 M, pH 7. La chromatographie se déroule à un débit de 3 ml/min pendant 55 min, sous une pression de 1,5 MPa, la détection des protéines se fait à 280 nm. Les fractions protéiques ainsi obtenues sont dialysées contre de l'eau distillée puis lyophilisées.

### 4 - Chromatographie de phase réverse en système HPLC

La dernière étape de chromatographie est une chromatographie liquide à haute pression (HPLC, Shimadzu) sur une colonne de phase

réverse Vydac C<sub>18</sub> (300 Å, 5 µm, 250x4,6 mm). Le système solvant utilisé est constitué d'un solvant A: eau distillée, 0,01% TFA (acide trifluoroacétique) (v/v) et d'un solvant B: 50% n-propanol, 0,08% TFA (v/v).

Les protéines obtenues par FPLC dissoutes dans 10% d'acide acétique, sont injectées sur la colonne C<sub>18</sub> équilibrée dans le solvant A. Les protéines sont ensuite éluées par un gradient linéaire de 25 à 50% en solvant B pendant 60 min à 0,3 ml/min. Les protéines purifiées sont détectées à 215 nm puis concentrées sur Speed-Vac et stockées à -20°C.

## C - TECHNIQUES ANALYTIQUES

### 1 - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont réalisées en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS), d'après la méthode de Laemmli (1970).

Deux gels sont superposés entre deux plaques de verre (1,5x140x180 mm, Bio-Rad). Le gel de séparation est un gel homogène à 15 % d'acrylamide dans un tampon Tris-HCl 10 mM, SDS 1 % (v/v), pH 8,9. Le gel de concentration est un gel à 5 % d'acrylamide dans le même tampon mais à pH 6,8.

Les échantillons sont solubilisés dans un tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,9 contenant 1 % de SDS, 10 % de glycérol et 0,5 % of β-mercaptoéthanol, puis placés au bain-marie à 100°C pendant 3 min. Les échantillons ainsi solubilisés sont déposés sur le gel d'acrylamide (2 à 30 µg de protéines par dépôt).

La migration est réalisée dans un tampon Tris 25 mM, Glycocolle 180 mM et 1 % SDS (v/v), à 20 mA, pendant une nuit sous réfrigération d'eau froide.

Après migration, les protéines sont révélées par le bleu de Coomassie.

## 2 - Dosage de protéines

Les concentrations en protéine lors des différentes étapes de chromatographie sont déterminées par la méthode de Lowry et al. (1951) modifiée par Peterson (1977).

5 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines en solution sont amenées à 1 ml par addition d'eau distillée. Après addition de 100  $\mu\text{l}$  de désoxycholate de sodium 0,15 %, les tubes sont agités et laissés à température ambiante pendant 10 min. Les protéines sont ensuite précipitées par addition de 100  $\mu\text{l}$  d'une solution d'acide trifluoroacétique à 72 %. Après agitation et centrifugation à 3000 g pendant 20 min, le surnageant est éliminé par aspiration. Après addition de 1 ml d'eau, le culot protéique est solubilisé par 1 ml de réactif A, mélangé et laissé 10 min à température ambiante. 500  $\mu\text{l}$  de réactif B sont ensuite ajoutés et la coloration est développée à l'obscurité pendant 30 min. La concentration en protéine est déterminée par lecture de l'absorbance à 750 nm contre une gamme étalon de sérum albumine bovine variant de 5 à 100  $\mu\text{g}$ .

Le réactif A est constitué de: 25 ml de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  à 0,4 % et de 50 ml de carbonate de sodium à 20 %. Un volume de cette solution est ensuite additionné à un volume de NaOH 0,8 N, un volume de SDS 10 % et un volume  $\text{H}_2\text{O}$ . Il se conserve 2 semaines à température ambiante et

à l'obscurité. Le réactif B est constitué de 1 volume de réactif au phénol de Folin-Ciocalteu (Merk) et de 5 volumes de H<sub>2</sub>O. Il est conservé à l'obscurité.

### 3 - Détermination des séquences N-terminales

Les enchaînements des acides aminés des parties N-terminales des protéines purifiées après chromatographies FPLC et HPLC, ont été déterminées au Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille.

### 4 - Chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire OV 201

La composition molaire en monosaccharides peut être déterminée par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse et triméthylsilylation suivant la méthode décrite par Kamerling et al. (1975). La technique permet de doser des quantités de l'ordre de 1 à 5  $\mu\text{g}$  de monosaccharides.

Aux échantillons à doser est ajouté 100  $\mu\text{l}$  d'une solution de mésoinositol (témoin interne) à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Après lyophilisation, la méthanolyse est réalisée dans un tube hermétiquement fermé, par 250  $\mu\text{l}$  de CH<sub>3</sub>OH/HCl 0,5 N pendant 24 h à 80°C. La solution est ensuite neutralisée par du carbonate d'argent ajouté grain par grain, puis N-réacétylée par 10  $\mu\text{l}$  d'anhydride acétique.

Après une nuit de repos à température ambiante et à l'obscurité, le tube est centrifugé. Le surnageant introduit dans une pipette Pasteur scellée à une extrémité, est délipidé 3 fois par 200  $\mu\text{l}$

d'heptane, puis évaporé sous azote. Le résidu sec est repris par 25  $\mu$ l de pyridine et 25  $\mu$ l de BSTFA (Bis Silyl Trifluoro Acétamide).

Après 3 h de réaction à température ambiante, les monosaccharides silylés sont analysés en chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire (0,2 mm x 25 m) remplie de silicone OV 201. La température est programmée de 120° à 240°C à raison de 2°C/min. Le débit du gaz vecteur (He) est de 1 ml, la pression d'entrée étant de 0,6 bars.

## D - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES

### 1 - Préparation des antisera dirigés contre l'angiogénine

#### a - Antisérum dirigé contre l'angiogénine totale

Un premier antisérum a été préparé chez le Lapin à partir de l'angiogénine obtenue après purification en système FPLC. Le procédé d'immunisation du Lapin est effectué selon la méthode décrite par Vaitukatis et al. (1971).

Un mélange renfermant 1 mg d'angiogénine bovine dissous dans 1 ml de sérum physiologique et 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet, est injecté sur le dos du Lapin en une quarantaine d'injections intradermiques. En parallèle, un vaccin anticoquelucheux est injecté en sous-cutané. Après 15 jours, 0,5 mg d'angiogénine dissous dans 0,5 ml de sérum physiologique sont à nouveau injectés avec 0,25 ml d'adjuvant de Freund complet. Un rappel est effectué tous les 15 jours, avec 0,25 mg d'angiogénine dissous dans 0,5 ml d'adjuvant de Freund complet.

A partir du troisième rappel, 20 ml de sang sont prélevés au Lapin et après une nuit à 4°C, le sérum est recueilli et conservé à -20°C.

b - Antisérum dirigé contre la séquence C-terminale  
de l'angiogénine

Le Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille a synthétisé le peptide C-terminal de l'angiogénine bovine renfermant les 10 acides aminés suivant: FDESFITPRH.

Un Lapin est immunisé avec 200  $\mu\text{g}$  de ce peptide greffé sur la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) dans 2 ml de PBS. L'injection est réalisée en sous-cutané au niveau de l'omoplate. Un premier rappel est réalisé, 7 jours après l'immunisation, par 300  $\mu\text{g}$  de peptide libre dans 1 ml de sérum physiologique additionné de 1 ml d'adjuvant complet de Freund. une semaine après ce premier rappel, une deuxième piqûre de rappel est réalisé de la même façon puis suivie 28 jours après l'immunisation de la première saignée.

2 - Electrotransfert sur feuille de nitrocellulose

Après électrophorèse, selon la technique de Towbin et al. (1979), les protéines ayant migrées en fonction de leur masse moléculaire, sont transférées électrophorétiquement sur une feuille de nitrocellulose (Schleicher et Schüll) dans un tampon: méthanol 20 %, glycolle 193 mM, Tris 25 mM, pH 8,4. L'électrotransfert est réalisé sous une tension de 200 mV, à 4°C pendant 3 h.

3 - Immunorévélation

Après le transfert des protéines sur la feuille de nitrocellulose, celle-ci est incubée dans un tampon PBS/2 % Tween 20 (polyoxyéthylène

sorbitan monolaurate, Sigma), 15 min afin de saturer les sites non occupés. Après 3 lavages par un tampon PBS/0,05 % Tween 20, la feuille est mise en contact pendant 3 h à température ambiante ou une nuit à 4°C, avec une solution d'anti-sérum anti-angiogénine dilué au 1/1000 dans le PBS/Tween 0,05 %. Après cette incubation, les anticorps en excès sont éliminés par 3 lavages par le PBS/Tween 0,05 %. Les complexes antigène-anticorps formés sont ensuite mis en évidence en utilisant des anticorps marqués à la peroxydase, dirigés contre les immunoglobulines IgG de Lapin (anticorps de Chèvre, Diagnostic Pasteur). L'incubation de ces anticorps dilués au 1/2500 dans le PBS/Tween 0,05 %, se fait pendant 1 h à température ambiante. Alors, 3 lavages au PBS sont réalisés pour éliminer l'excès d'anticorps mais aussi le Tween 20, détergent incompatible pour la suite des expériences. La révélation est réalisée par 30 mg de 3,3' diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Fluka) dissous dans 100 ml de PBS en présence de 1 ml d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 110 volumes.

## II - ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE

### ISOLEE DU LAIT DE VACHE

#### A - MATERIELS

##### 1 - Nature des échantillons

Les études qualitatives et quantitatives ont été réalisées avec l'angiogénine pure isolée du lait de Vache Fraction II-2 obtenue par FPLC).

L'Institut de Biotechnologie de Vitry (Rhône-Poulenc Santé) nous a généreusement fourni un peu d'angiogénine humaine recombinante, produite chez Escherichia coli (Denefle et al., 1987). Nous avons donc eu la possibilité de réaliser une étude comparative de l'activité angiogénique des angiogénines bovine et humaine.

Enfin, la ribonucléase isolée du lait de Vache a été utilisée dans le cadre de la recherche d'une éventuelle activité angiogénique.

## 2 - Préparation des échantillons

Les protéines sont dissoutes stérilement dans une solution de méthylcellulose à 1 % dans le PBS, sous agitation pendant 12 h à 4°C. Ensuite, 10 µl des différentes dilutions de protéines ainsi préparées, sont déposées sur du parafilm, puis séchées sous air stérile. Des pastille "témoins" sans protéine sont préparées de la même façon.

La réalisation de ces pastilles est indispensable lors de l'étude visuelle, afin de permettre une recherche orientée de la croissance des vaisseaux sanguins. Pour l'étude quantitative, nous avons, en fait, simplifié ceci en déposant les échantillons dilués dans 100 µl de PBS sur un filtre Millipore stérile de 0,45 µm, déposé sur la CAM.

Pour chaque concentration d'échantillons, une vingtaine d'oeufs sont utilisés à chaque expérience, l'expérience étant répétée au minimum 3 fois. De plus, à chaque fois, une dizaine d'oeufs sont utilisés comme témoins, les pastilles alors déposées ne renferment que du PBS.

**B - EVALUATION VISUELLE DE L'ANGIOGENESE**  
**DANS LA CAM**

Le protocole a été décrit par Ausprunk et al. (1974). Les différentes étapes effectuées le plus stérilement possible, sont les suivantes:

- Jour 0 : Les oeufs de Poule fécondés sont réceptionnés et orientés;
- Jour 2 : Les oeufs sont placés en couveuse à 37°C;
- Jour 3 : 2 ml de blanc d'oeuf sont prélevés à l'aide d'une seringue. Le trou effectué dans la coquille est ensuite rebouché avec de la paraffine;
- Jour 4 : Une fenêtre est percée dans la coquille sur le dessus de l'oeuf, puis occultée par du ruban adhésif;
- Jour 9 : Les pastilles d'angiogénine sont déposées directement sur la CAM à travers la fenêtre;

La lecture est ensuite réalisée du dixième au treizième jour d'incubation en couveuse. Celle-ci se fait à l'aide d'un binoculaire.

**C - EVALUATION QUANTITATIVE DE L'ANGIOGENESE**  
**SUR LA CAM**

La technique utilisée a été décrite par Splawinski et al. (1988), il s'agit d'une simplification de celle décrite par Thompson et al. en 1985. Le principe consiste en la détermination de la croissance des vaisseaux sanguins par la mesure de l'incorporation de méthyl [ $H^3$ ]-thymidine dans les ADN.

Les premières étapes de cette technique sont identiques à celles précédemment citées. Une petite modification: les oeufs fécondés sont placés en couveuse dès réception à Jour 1, le dépôt des échantillons est réalisé au Jour 10.

Au onzième jour d'incubation en couveuse, soit environ 22 h après le dépôt des échantillons, 2  $\mu\text{Ci}$  de méthyl [ $\text{H}^3$ ]-thymidine dans 100  $\mu\text{l}$  de PBS sont ajoutés sur la CAM.

Après 2 h d'incubation en couveuse, les oeufs sont placés à  $-20^\circ\text{C}$ , 30 min. La CAM est ensuite recueillie, rincée par du PBS refroidi dans la glace, puis homogénéisée dans 8 ml d' $\text{H}_2\text{O}$  pendant 5 min à  $4^\circ\text{C}$ , et enfin, soumise aux ultra-sons pendant 30 sec à  $4^\circ\text{C}$ . 100  $\mu\text{l}$  de l'homogénat ainsi obtenu, sont alors prélevés afin de déterminer l'incorporation totale de méthyl [ $\text{H}^3$ ]-thymidine dans la CAM.

Au reste de l'homogénat sont ensuite ajoutés 10 ml d'acide perchlorique à 10 % refroidi dans la glace, puis centrifugé à 4500 t/min, 10 min à  $4^\circ\text{C}$ . Le précipité obtenu est alors lavé 2 fois par la même solution d'acide perchlorique, puis successivement par 5 ml d'éthanol à 96 %, 5 ml d'éthanol/éthyl éther à 96 % (4:1 v/v) et enfin par 5 ml d'éthyl éther. L'éther est ensuite évaporé sous  $\text{N}_2$ .

Le précipité est ensuite traité par 5 ml d'acide perchlorique à 5 % et chauffé 30 min à  $96^\circ\text{C}$ . Après centrifugation, 0,5 ml du surnageant est neutralisé par une solution de  $\text{NaOH}$  0,1 N et la radioactivité est estimée à l'aide d'un compteur à scintillation.

Chaque mesure est réalisée en triple exemplaire. La radioactivité mesurée dans chaque fraction ainsi obtenue est exprimée en % par rapport à la radioactivité totale incorporée dans la CAM.

### III - ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE

#### A - MATERIELS

##### 1 - Nature et préparation des facteurs utilisés

Dans ces expérimentations, nous avons recherché une activité mitogène de l'angiogénine du lait de Vache, activité qui une fois définie, a été comparée à celle de l'angiogénine humaine recombinante.

L'étude des activités mitogènes a été réalisée en présence de témoins: cellules cultivées en présence de facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF). Le bFGF est purifié à partir de l'hypophyse de Boeuf, il nous a été généreusement fourni par le SERLIA de l'Institut Pasteur de Lille.

Enfin, des essais d'inhibition de l'activité mitogène de l'angiogénine ont été réalisés avec un inhibiteur de ribonucléase isolé du placenta humain (PRI) de chez Promega (RNasin).

Des solutions de ces quatre facteurs: angiogénine bovine et humaine, bFGF, PRI, sont préparées dans le milieu de culture des cellules (DMEM ou MEM) supplémenté de 0,5 % de BSA (Albumine Schwartzmann bovine, COGER), puis filtrées stérilement. Les solutions, à différentes concentrations, sont ajoutées à raison de 10  $\mu$ l/ml de milieu de culture.

##### 2 - Culture des cellules endothéliales

Nos expérimentations ont été réalisées sur deux types de cellules endothéliales: des cellules de petits vaisseaux (capillaires cérébraux de Boeuf), ainsi que des cellules de gros vaisseaux (aorte de Boeuf).

a - Culture des cellules endothéliales de capillaires  
cérébraux de Boeuf (BBCE)

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE) sont isolées selon la technique décrite par Méresse et al (1989).

Les microvaisseaux sont isolés d'un hémisphère de cerveau de Boeuf, homogénéisés mécaniquement puis ensemencés sur des matrices extracellulaires sécrétées par des cellules endothéliales de cornée de Boeuf. Cinq jours après l'ensemencement, les premières cellules endothéliales migrent des capillaires et commencent à former des colonies. Quand les colonies sont suffisamment larges, elles sont trypsinisées et ensemencées sur des boîtes traitées à la gélatine (35 mm, un clone/boîte) dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) supplémenté avec 15 % de sérum de Veau (CS, Séromed), 2 mM de glutamine, 50 µg/ml de gentamicine, 2,5 µg/ml de fungizone et 1 ng/ml de bFGF (ajouté tous les 2 jours).

Arrivées à confluence, les cellules endothéliales sont ensemencées sur des boîtes traitées à la gélatine de 60 mm, après 6 à 8 jours les cellules confluentes sont repiquées au 1/20<sup>ème</sup>. Au 3<sup>ème</sup> passage, ces cellules sont stockées dans l'azote liquide. Pour les expérimentations, les cellules sont cultivées dans le milieu complet et placées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

Le milieu complet est changé tous les deux jours. Le repiquage des cellules s'effectue une fois par semaine au 1/15<sup>ème</sup>, ceci jusqu'au 10<sup>ème</sup> passage.

### b - Culture de cellules endothéliales d'aorte de Boeuf (BAAE)

L'isolement des cellules endothéliales d'aorte de Boeuf (BAAE) est réalisé selon la technique décrite par Gospodarowicz et al. (1976).

Les BAAE sont cultivées dans un milieu DMEM complet identique à celui utilisé pour les BBCE, mais avec seulement 10 % de CS, de plus, seul le bFGF est ajouté tous les 2 jours. Les cultures sont réalisées à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont repiquées une fois par semaine au 1/30<sup>ème</sup>.

### 3 - Culture des fibroblastes (CCL39)

Les fibroblastes de poumon de Hamster chinois de la lignée CCL39 proviennent de l'ATCC (American Type Culture Collection). Ces cellules sont cultivées dans un milieu essentiel minimum (MEM, sels de Earles, Gibco) contenant 10 % de sérum de Veau foetal (FCS, Gibco), 0,4 % de streptomycine, 0,4 % de pénicilline et 0,5 % de fungizone. Les cultures sont placées à 37°C, dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les repiquages des cellules s'effectuent 2 fois par semaine au 1/10<sup>ème</sup>.

## B - MESURE DE LA CROISSANCE CELLULAIRE

### 1 - Principe

Les cellules sont cultivées dans un milieu minimum supplémenté en angiogénine. Parallèlement, des cultures de cellules en milieu minimum ou complet sont réalisées en tant que témoins. Le nombre de cellules obtenu en fin de croissance est alors comparé d'une culture à l'autre.

## 2 - Protocole expérimental

Les cellules BBCE et BAAE sont ensemencées dans des plaques de 6 puits (Corning) traitées à la gélatine, à raison de  $10^4$  cellules/35mm dans 2 ml de DMEM supplémenté avec du sérum de Veau (10 ou 15 % suivant les cellules).

Les cellules CCL39 sont ensemencées dans des plaques de 6 puits (Corning), à raison de  $8 \times 10^4/35$  mm, dans 2 ml de MEM-sels de Earles, supplémenté avec seulement 0,2 % de FCS.

Immédiatement après l'ensemencement, sont ajoutés les différents facteurs: le bFGF (1 ng/ml), ou différentes concentrations en angiogénine, ou/et le PRI (ou encore du FCS à 2 % pour les CCL39). Chaque facteur est analysé en triple.

Les milieux ainsi constitués sont changés tous les 2 jours (pour les BAAE et les CCL39, seuls les facteurs sont ajoutés). Après 5 jours (seulement 3 pour les CCL39) de culture, les cellules sont décollées par la trypsine, puis comptées à l'aide d'une cellule de Malassez.

## C - MESURE DE LA SYNTHÈSE D'ADN

### 1 - Principe

Les cellules sont ensemencées normalement dans un milieu complet. Les cellules ainsi obtenues sont ensuite mises au repos (cellules quiescentes) par privation de sérum et donc de tout facteur de croissance. Ces cellules quiescentes sont arrêtées dans leur processus de division mais elles sont susceptibles d'y retourner, sous l'action d'un stimulus extérieur, par exemple, sous l'action des facteurs de

croissance. La reprise du cycle cellulaire est alors déterminée par mesure de la synthèse d'ADN par l'intermédiaire de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine. Dans ce cas, nous ne mesurons pas plusieurs cycles cellulaires complets, comme pour la technique de numération cellulaire, mais uniquement une phase spécifique du cycle cellulaire, nommée S.

## 2 - Technique appliquée aux fibroblastes

La mesure de la synthèse d'ADN est menée selon la méthode de Ploüet et al. (1984), avec quelques modifications. Les cellules CCL39 sontensemencées dans des plaques de 24 puits (Nunc) à raison de  $4 \cdot 10^4$  cellules dans 0,5 ml de MEM-sels de Earle, supplémenté avec 10 % de FCS. Lorsque les cellules ont atteint la confluence (environ 72 h), les cellules sont lavées avec du milieu de culture dépourvu en FCS, puis incubées dans ce milieu pendant 24 h. Les cellules sont alors dans une phase d'arrêt, au repos, les fractions à analyser sont alors ajoutées au milieu. Après 24 h d'incubation, 1  $\mu$ Ci de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine (Amersham) dans 10  $\mu$ l de PBS est ajoutée.

Après encore 4 h d'incubation, l'incorporation de thymidine tritiée est stoppée par lavage des cellules par du PBS. Les cellules sont ensuite fixées par l'acide trichloroacétique à 5 % pendant 30 min, lavées à l'eau courante et lysées par la soude 0,1 N (0,5 ml/puits) pendant 2 h à 37°C.

Le contenu de chaque puits est alors transféré dans une fiole à scintillation dans laquelle sont ajoutés 3 ml de liquide scintillant (Aqualite, Baker). La radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur beta (Beckman).

### 3 - Technique appliquée aux cellules endothéliales

Nous avons dû mettre au point une technique applicable aux cellules endothéliales. Les cellules BBCE sont cultivées pendant 36 h dans des boîtes de 24 puits ( $2 \cdot 10^3$  cellules/16 mm) dans 0,4 ml de DMEM supplémenté avec 15 % de CS et 1 ng/ml de bFGF. Après un lavage par du DMEM sans CS, les cellules sont incubées 24 h dans un milieu DMEM supplémenté avec 1 % de CS. Les cellules quiescentes ainsi obtenues sont à nouveau rincées, puis incubées dans du DMEM sans CS supplémenté des facteurs de croissance à tester ainsi que de la méthyl- $^3\text{H}$ -thymidine (Amersham, 1  $\mu\text{Ci}$ /puits). Après différents temps de stimulation, les cellules sont trypsinisées et recueillies dans 2 ml d'acide trichloroacétique à 10 %. Le précipité obtenu est collecté sur filtre de fibres de verre et lavé par de l'acide trichloroacétique à 10 % (3x5 ml), puis 2 ml d' $\text{H}_2\text{O}$ , 2 ml d'éthanol. Les filtres sont alors transférés dans une fiole à scintillation dans laquelle sont ajoutés 5 ml de liquide scintillant (Ready self). La radioactivité est ensuite déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation Beta (LKB).

## IV - CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES

### A - MATERIELS

#### 1 - Protéines

Ces expériences ont toutes été réalisées avec l'angiogénine purifiée à partir du lait de Vache. Les autres protéines que nous avons utilisées sont la ribonucléase pancréatique bovine A (RNase A) de chez Sigma,

l'inhibiteur placentaire de ribonucléase RNasin (PRI) de chez Promega et enfin l'albumine Schwartzmann bovine (BSA) de chez Coger.

## 2 - Cellules

Trois types cellulaires ont été utilisés: les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE), les cellules endothéliales d'aorte de Boeuf (BAAE) et les fibroblastes de poumon de Hamster chinois (CCL39).

La culture de ces cellules a été décrite dans les pages 90 et 91.

## B - RADIOMARQUAGE DES PROTEINES

Le marquage de l'angiogénine et de la RNase A est réalisé par la méthode à l'Iodo-Gen (Pierce).

Des tubes à hémolyse en verre sont tapissés par 100  $\mu\text{g}$  de Iodo-Gen mis en solution dans du chloroforme, à raison de 1 mg/ml. Après évaporation sous un courant d'azote, la solution de protéine est placée dans ce tube (200  $\mu\text{g}$ /200  $\mu\text{l}$  de PBS) ainsi que 5  $\mu\text{l}$  de la solution d'iode 125 (5mCi/50 $\mu\text{l}$ ; 625 MBq de  $^{125}\text{I}$ / $\mu\text{g}$  iode; Amersham). Le tube est ensuite placé dans la glace, sous agitation douce pendant 15 mn.

La protéine ainsi marquée à  $^{125}\text{I}$  est séparée de l'iode en excès par gel filtration sur une colonne de Séphadex G-25 (PD10, Pharmacia) équilibrée dans le PBS.

La radioactivité spécifique est déterminée après dosage des protéines et comptage de la radioactivité à l'aide d'un compteur multigamma (Compu Gamma, LKB), celle-ci varie de 15.000 à 30.000 cpm/ng.

Les protéines ainsi marquées sont utilisées le jour même.

## C - REALISATION DES DOSAGES RADIORECEPTEURS

### 1 - Cinétique de fixation

Les cellules BBCE et BAAE sont ensemencées dans des plaques de 6 puits (page 50) dans un milieu DMEM supplémenté en 15 % de CS et 1 ng/ml de bFGF, pendant 5 jours. Après rinçage, les cellules sont ensuite incubées pendant 2 h à 37°C, dans un milieu DMEM, 10 mM Hepes, pH 7,4, 0,5 % BSA. Les mesures de la fixation de l' $[^{125}\text{I}]$ -angiogénine sont ensuite réalisées à 4°C dans 700  $\mu\text{l}$  de DMEM, 10 mM Hepes, pH 7,4, 0,5 % BSA et 15 ng/ml de  $[^{125}\text{I}]$ -angiogénine ou RNase.

Parallèlement, la fixation non spécifique est réalisée dans les mêmes conditions, en présence de 100 excès molaire d'angiogénine ou de RNase non marquées.

Après différents temps d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois par du PBS, 1 fois par du PBS, 0,6 M NaCl et à nouveau 3 fois par du PBS. Les cellules sont ensuite solubilisées dans 1 ml de NaOH 0,1 M.

La radioactivité associée aux cellules est déterminée à l'aide d'un compteur multigamma (LKB).

### 2 - Dosage par saturation

Les dosages par saturation sont réalisés dans des conditions identiques à celles décrites précédemment, en présence de différentes concentrations en  $[^{125}\text{I}]$ -angiogénine marquée ou non marquée. Les incubations sont ensuite réalisées à 4°C pendant 2 h.

### 3 - Analyse de la fixation de l'angiogénine en présence de cuivre et de PRI

Au milieu d'incubation sont ajoutés 100  $\mu\text{M}$  de cuivre ou 1 nM de PRI. La mesure de la fixation de l' $[^{125}\text{I}]$ -angiogénine (15 ng/ml) se fait après 2 h d'incubation à 4°C.

#### D - SOLUBILISATION DES PROTEINES MEMBRANAIRES

Les cellules BBCE et BAAE sont cultivées dans des boîtes de 100 mm (Corning) pendant 5 jours. Après un rinçage par un tampon Tris-HCl 50 mM, pH 6,5 contenant 1 mM de phénylméthylsulfonyl fluoride, les cellules sont récupérées par grattage dans le même tampon.

Les cellules sont ensuite centrifugées à 1000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire obtenu est alors lysé dans le même tampon contenant 1 mM de diisopropyl fluoride phosphate et 1 % de Triton X-100, à 4°C pendant 30 min.

Les protéines membranaires solubilisées sont ensuite obtenues par centrifugation à 14000 g pendant 10 min.

#### E - ELECTROPHORESE ET ELECTROTRANSFERT DES PROTEINES MEMBRANAIRES SOLUBILISEES

Les protéines solubilisées (80  $\mu\text{g}$ ) sont déposées sur un gel de polyacrylamide (5-15 %, p. 3) en présence de SDS. Les 80  $\mu\text{g}$  de protéines sont déposées dans le tampon échantillon contenant seulement 1 % de SDS.

Les protéines membranaires séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide sont ensuite transférées par électrophorèse sur une feuille de nitrocellulose selon la méthode décrite par Towbin et al. (1979) (p. 84).

#### F - VISUALISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE

Après électrotransfert, la nitrocellulose est incubée pendant 2 h dans un tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8, NaCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM contenant 10 % BSA, afin de saturer tous les sites de fixation non spécifique.

Une deuxième incubation de 2 h est ensuite réalisée dans le même tampon contenant 0,5 % de BSA et 30 ng/ml de [<sup>125</sup>I]-angiogénine.

Parallèlement, la même incubation est réalisée en présence de 100 excès molaire d'angiogénine non marquée.

Après plusieurs lavages dans le même tampon sans angiogénine, la membrane de nitrocellulose est séchée, puis autoradiographiée à -70°C pendant 3 jours.

# RESULTATS

## I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE

Lors d'une purification de lactotransferrine à partir du lait de Vache, une fraction renfermant des contaminants très basiques dont les masses moléculaires sont d'environ 15 à 16 kDa, a été mise en évidence. La fraction fût confiée à Damart qui purifia une protéine de masse moléculaire apparente de 15 kDa. Cette protéine fût ensuite transmise au Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille dirigé par le Professeur A. Tartar, pour la détermination de la séquence N-terminale. Les résultats révélèrent une homologie importante de cette séquence N-terminale avec celle de l'angiogénine humaine. Par la suite, cette équipe s'attacha à établir la séquence primaire totale de l'angiogénine isolée du lait de Vache (Maes et al., 1988).

Dans le protocole de purification mis au point par Damart, une fraction de l'angiogénine était contaminée par une protéine basique de masse moléculaire voisine. Au cours de nos études, nous avons amélioré le protocole de purification de l'angiogénine et nous avons identifié la protéine contaminante, grâce à la collaboration avec le Laboratoire du Professeur Tartar.

Dans ce chapitre, nous décrivons, donc, une méthode de préparation de l'angiogénine du lait de Vache, qui permette de fournir rapidement et avec un excellent rendement de l'angiogénine pure.



## A - PURIFICATION DE L'ANGIOGENINE DU LAIT DE VACHE PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE DE CATIONS

L'angiogénine est une protéine basique, sa purification se fait simplement par trois chromatographies successives sur échangeurs de cations.

### 1 - Chromatographie de "Batch-adsorption" des protéines basiques du lait de Vache

Pour réaliser la purification d'un facteur qui existe en quantité faible dans un mélange complexe comme le lait, le choix de l'échangeur de cations est très important. En effet, le lait de Vache renferme un taux relativement important de protéines basiques qui possèdent un comportement chromatographique voisin de celui de l'angiogénine. Les premières expériences réalisées avec du gel SP-Séphadex C-50 fournissaient des fractions très enrichies en protéines, en particulier en lactotransferrine et présentaient le désavantage d'être assez longues à cause d'un débit ralenti de l'élution sous l'effet de l'augmentation de la force ionique des tampons d'élution.

L'utilisation, par la suite, de l'échangeur SP-Séphadex C-25 nous a permis de diminuer considérablement le coût et le temps de préparation. En effet, le gel SP-Séphadex C-25 fixe sélectivement les protéines basiques de faibles masses moléculaires d'une part, et d'autre part, ce gel est nettement moins sensible aux variations de la force ionique des tampons d'élution.

Après la mise en contact du gel et des protéines basiques du lait de Vache, il est important de réaliser l'élution de ce gel en colonne,

non pas en "Batch". Nous avons remarqué, en effet, qu'une élution en "Batch" est inefficace, les protéines isolées ne s'éluent jamais dans une seule fraction. Notamment, l'angiogénine se retrouve présente dans toutes les fractions éluées quelque soit la force ionique utilisée.

Le gel SP-Séphadex C-25 monté en colonne, est d'abord rincé par 1,5 l d'acétate de sodium 0,2 M. Ensuite, l'élution par 3 l d'acétate de sodium 0,6 M permet d'obtenir une fraction enrichie en protéines basiques de faibles masses moléculaires (Fig. 12, p.102). Le passage de 1,5 l d'acétate de sodium 2 M permet d'éliminer les protéines adsorbées sur le gel. Une fois régénéré par NaOH 0,1 N puis HCl 0,1 M, le gel est alors réutilisable.

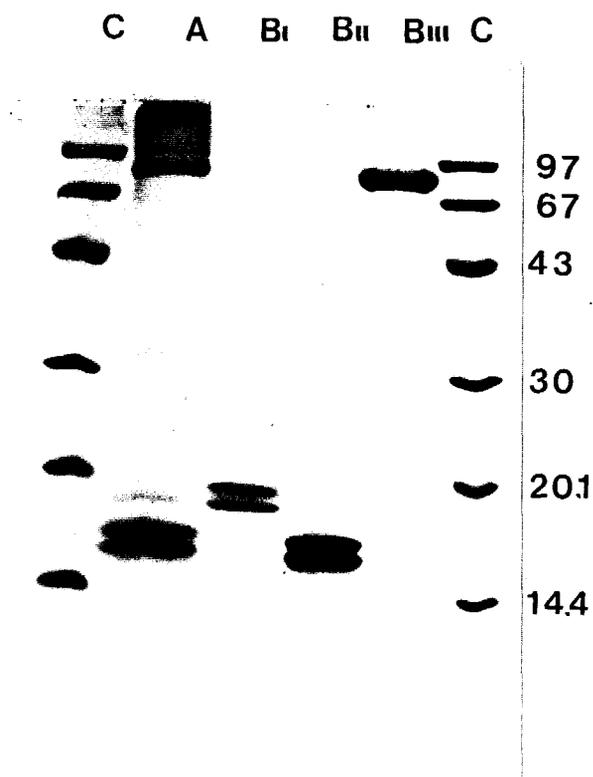
## 2 - Chromatographie sur échangeur de cations

### S-Sépharose Fast Flow

Cette deuxième étape de chromatographie d'échange de cations permet d'une part, d'éliminer rapidement et totalement toutes traces de protéines basiques de masses moléculaires élevées, notamment la lactotransferrine. D'autre part, elle permet d'obtenir une fraction très enrichie en angiogénine.

Une première fraction est obtenue lors de l'élution du gel S-Sépharose Fast Flow par 1 l d'une solution d'acétate de sodium 0,4 M, nommée Fraction I. La Fraction I renferme essentiellement deux protéines de masses moléculaires apparentes 18 et 19 kDa (Fig. 12, p.102), dont la nature est encore inconnue.

L'élution de la colonne se poursuit par passage de 1 l d'acétate de sodium 0,6 M. La fraction protéique ainsi obtenue, que nous nommons Fraction II, est constituée, en majeure partie, de deux protéines



**Figure 12** : Analyse en gel de polyacrylamide (15%) en présence de SDS, des fractions obtenues lors des deux premières étapes de chromatographie d'échange de cations.

**A**: Fraction éluée du gel SP-Séphadex C-25 (0,6 M acétate de sodium)

**B**: Fractions éluées de la colonne de S-Sépharose Fast Flow

**BI** : Fraction I (0,4 M acétate de sodium)

**BII** : Fraction II (0,6 M acétate de sodium)

**BIII** : Fraction III (1,5 M acétate de sodium)

**C**: Témoin de masses moléculaires (Pharmacia)

basiques: l'angiogénine de masse moléculaire apparente 15 kDa, ainsi que d'une autre protéine basique de masse moléculaire apparente de 16 kDa (Fig. 12, p.102 ). L'angiogénine est, au cours de ce fractionnement, identifiée après électrotransfert sur feuille de nitrocellulose, suivie d'une immunorévélation par un antisérum dirigé spécifiquement contre l'angiogénine.

La dernière fraction, la Fraction III, est éluée de la colonne par 1 l d'acétate de sodium 1,5 M. Cette Fraction est constituée d'environ 90 % de lactotransferrine (Fig. 12, p.102 ). La lactotransferrine est également identifiée après électrotransfert et immunorévélation par un antisérum dirigé contre celle-ci.

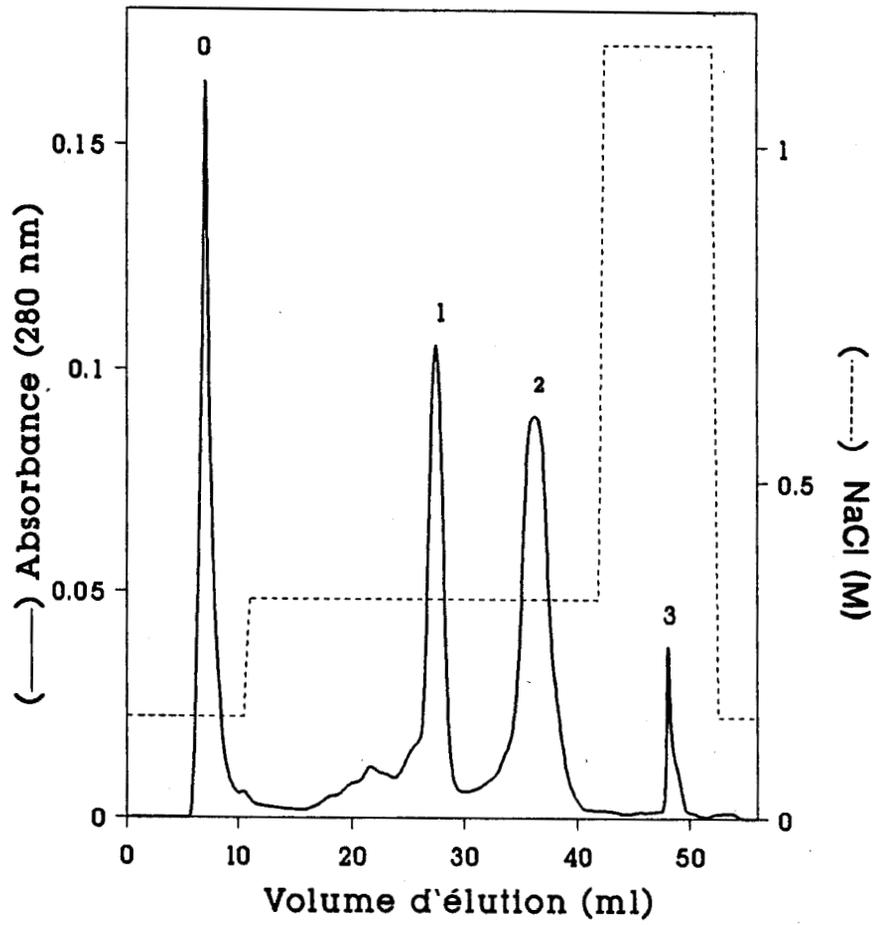
Un dosage de protéines montre que la chromatographie sur colonne de S-Sépharose Fast Flow fournit 100 à 300 mg de Fraction II enrichie en angiogénine.

### 3 - Chromatographie d'échange de cations en système FPLC

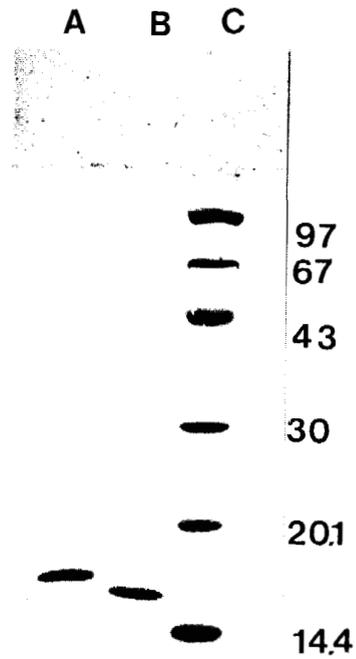
La Fraction II précédemment obtenue, est soumise à une dernière étape de chromatographie d'échange de cations en système FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur colonne Mono-S. Le système FPLC permet grâce à ce gel de haute résolution, d'obtenir de l'angiogénine du lait de Vache à l'état très pur.

Le profil d'élution de la colonne Mono-S présenté dans la Fig. 13 (p.104), montre que deux fractions sont éluées à la même force ionique, c'est à dire lors de l'élution par une concentration de 325 mM en NaCl.

L'analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS des fractions II-1 et II-2 ainsi préparées (Fig. 14, p.105), montre d'une part, que la Fraction II-1 renferme une protéine de 16 kDa et des traces



**Figure 13 :** Chromatographie en système FPLC sur colonne Mono-S de la Fraction II (éluee de la colonne de S-Sépharose Fast Flow).



**Figure 14** : Analyse en gel de polyacrylamide (15 %) en présence de SDS, des Fractions 1 et 2 obtenues après chromatographie FPLC de:

**A** : Fraction II-1

**B** : Fraction II-2 : Angiogénine

**C** : Témoin de masses moléculaires (Pharmacia)

d'une autre de 15 kDa, alors que la Fraction II-2 est constituée d'une seule bande protéique d'environ 15 kDa.

L'analyse au microséquenceur de la Fraction II-2 a révélé que celle-ci correspondait à l'angiogénine du lait de Vache décrit par Maes et al. en 1988. La Fig.14 (p.105) montre que l'angiogénine du lait de Vache possède une masse moléculaire apparente de 15 kDa, la masse moléculaire réelle de l'angiogénine, calculée à partir de sa séquence en acides aminés est de 14,577 kDa.

La chromatographie sur colonne Mono-S a donc montré que la Fraction II est constituée de 30 % de Fraction II-1 de nature inconnue et de 30 % d'angiogénine (Fraction II-2).

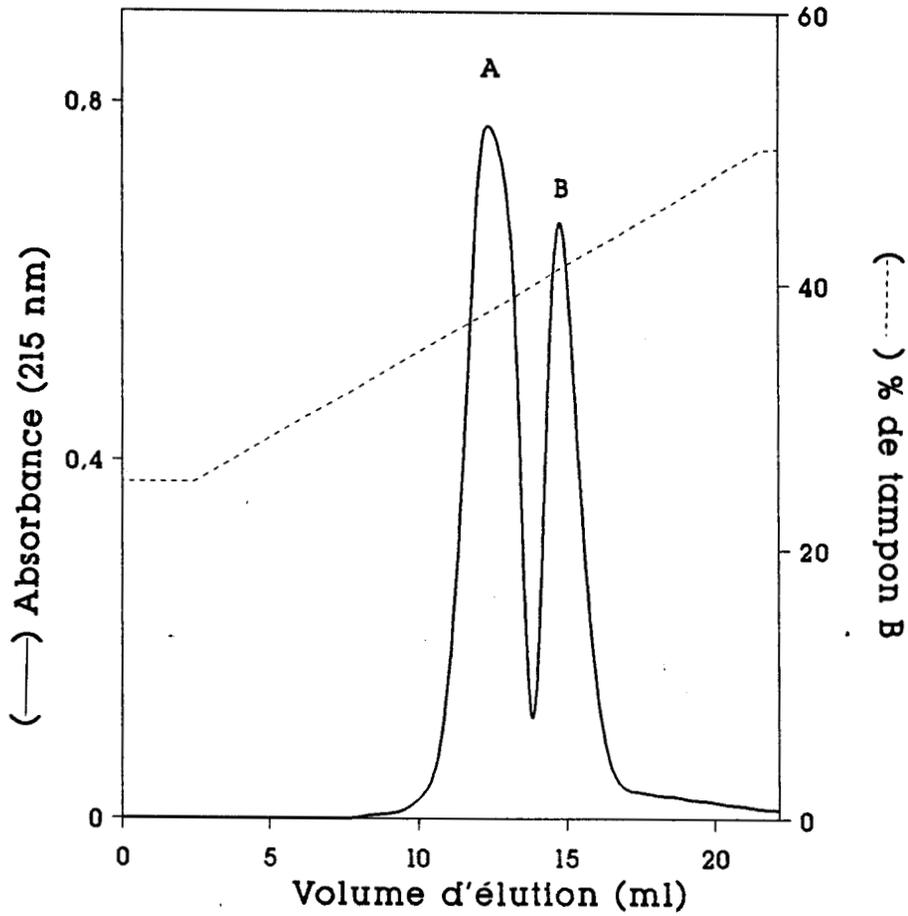
Cette méthode de purification fournit donc 30 à 90 mg d'angiogénine à partir d'un fractionnement de 20 l de lait de Vache.

## **B - ANALYSE ET PURIFICATION EN SYSTEME HPLC**

L'ultime étape dans le fractionnement des protéines permet de séparer et d'identifier les protéines de la Fraction II-1 obtenue après chromatographie en système FPLC, et aussi de vérifier la pureté de l'angiogénine bovine.

### **1 - Chromatographie en phase réverse de la Fraction II-1**

La Fraction II-1 obtenue par chromatographie de la Fraction II sur colonne de Mono-S, est injectée sur colonne hydrophobe Vydac C<sub>18</sub>. Le chromatogramme obtenu (Fig. 15, p.107) montre deux pics élués à environ 35-45 % du tampon B.



**Figure 15 :** Chromatographie de phase réverse en HPLC sur colonne Vydac C<sub>18</sub>, de la Fraction II-1 (éluée de la colonne Mono-S en FPLC).

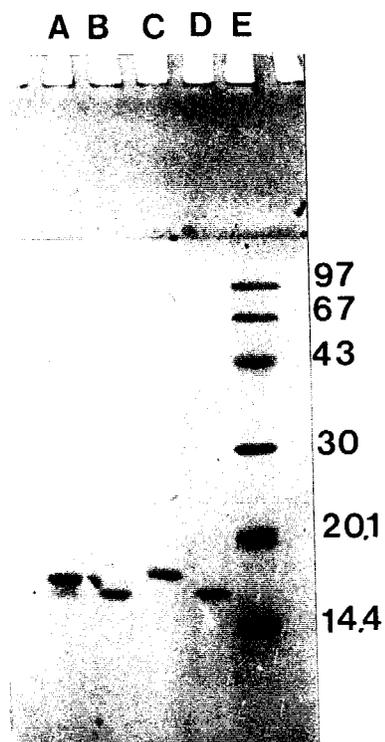
Les deux pics sont désignés Fractions II-1-A et II-1-B. Leur analyse en gel de polyacrylamide en présence de SDS montre que chaque fraction est constituée d'une seule protéine (Fig. 16, p.109), de masse moléculaire apparente de 16 kDa pour la Fraction II-1-A et de 15 kDa pour la Fraction II-1-B.

La détermination de la séquence N-terminale de la Protéine II-1-A a révélé l'existence de l'acide pyroglutamique. L'analyse de la séquence en acides aminés des peptides libérés par l'action du bromure de cyanogène et la protéase V8 de Staphylococcus aureus, montre que la Protéine II-1-A possède un taux d'homologie important avec celle de la ribonucléase BL4 (Fig.17, p.110) isolée du foie de Boeuf (Hofsteenge et al., 1989). L'identité des séquences connues entre la Protéine II-1-A et la RNase BL4 étant totale, nous avons décidé de ne pas poursuivre la détermination de la séquence en acides aminés de cette protéine.

La Fig. 17 (p.110) montre également que la Protéine II-1-A est un membre de la famille des ribonucléases. La RNase A pancréatique bovine, l'angiogénine du lait de Vache, la RNase BL4 du foie de Boeuf et la Protéine II-1-A du lait de Vache, possèdent environ 40 % d'identité structurale.

Contrairement à l'angiogénine, et comme le montre la Fig. 16 (p.109), la Protéine II-1-A possède une masse moléculaire apparente bien supérieure à sa masse moléculaire réelle. En effet, en gel de polyacrylamide, la Protéine II-1-A se présente comme une bande homogène de 16 kDa, elle migre moins loin que l'angiogénine, alors que sa masse moléculaire estimée d'après la séquence en acides aminés de la RNase BL4 du foie de Boeuf est de 13 kDa.

La Protéine II-1-A possède en position 21, une séquence Asn-Asp-Ser (Fig.17, p.110), séquence caractéristique des sites de



**Figure 16** : Analyse en gel de polyacrylamide (15 %) en présence de SDS, des protéines de la Fraction II-1, avant et après séparation en HPLC.

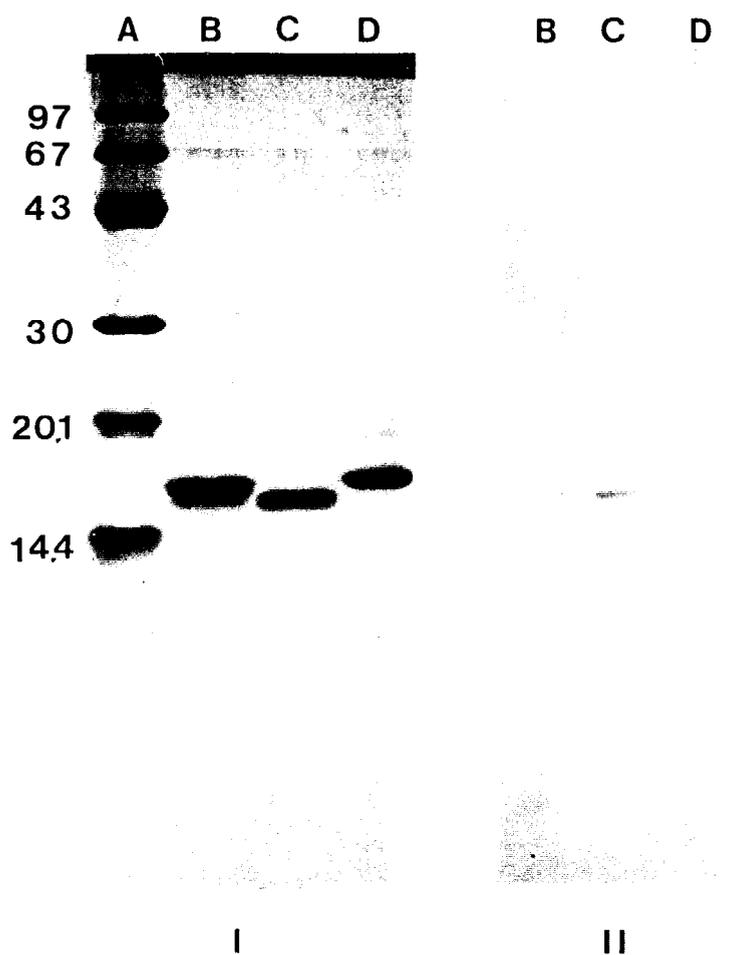
- A** : Fraction II-1 (FPLC)
- B** : Fraction II-2 (FPLC)
- C** : Protéine II-1-A (HPLC)
- D** : Protéine II-1-B (HPLC)
- E** : Témoin de masses moléculaires (Pharmacia)



glycosylation des N-glycosyl protéines (Marshall, 1972). Nous avons donc cherché à savoir si cette différence de masse moléculaire ne pouvait pas être due à un glycanne. Nous avons donc utilisé la chromatographie en phase gazeuse sur colonne OV 201, pour rechercher la présence éventuelle de monosaccharides. Les résultats obtenus ont montré que la Protéine II-1-A ne renferme pas une quantité détectable de monosaccharide.

Le séquençage des dix premiers acides aminés N-terminaux de la Protéine II-1-B a permis de montrer une identité totale avec la séquence N-terminale de l'angiogénine bovine. Comme la séquence totale de cette Protéine n'a pas été déterminée, nous ne pouvons conclure à une identité totale, pourtant, nous avons choisi de la nommer arbitrairement "bis-angiogénine". Néanmoins, comme le montre la Fig.16 (p.109), la "bis-angiogénine" présente la même masse moléculaire apparente que l'angiogénine de 15 kDa.

Afin de compléter ces identifications protéiques, nous avons réalisé une analyse immunologique de l'angiogénine et des protéines de la Fraction II-1, ainsi que de la ribonucléase pancréatique A bovine. Cette analyse a été effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide 15 % en présence de SDS, suivie d'un électrotransfert sur feuille de nitrocellulose. Les protéines ayant migré suivant leur masse moléculaire (Fig. 18, p.112) sont ensuite révélées par un antisérum anti-angiogénine bovine selon la technique de Towbin et al. (1979). Une seule bande a pu être mise en évidence après révélation par l'antisérum (Fig. 18, p.112). La bande se situe à 15 kDa, elle est présente dans la Fraction II-2 (angiogénine bovine purifiée), ainsi que dans la Fraction II-1. Donc, malgré les 35 % d'homologie structurale entre l'angiogénine et les autres ribonucléases, aucune réaction immunologique croisée n'est



**Figure 18** : Immunorévélation de l'angiogénine par un antisérum dirigé contre l'angiogénine isolée du lait du Vache

I : Migration électrophorétique en gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS

II : Électrotransfert sur feuille de nitrocellulose

- A : Témoin de masses moléculaires (Pharmacia)
- B : Ribonucléase du lait de Vache
- C : Angiogénine du lait de Vache
- D : Ribonucléase pancréatique A bovine (Sigma)

mise en évidence. Néanmoins, nous avons montré que l'antisérum anti-angiogénine bovine reconnaît également la "bis-angiogénine" de la Fraction II-1. L'immunorévélation par un antisérum dirigé contre l'angiogénine montre que l'angiogénine et la "bis-angiogénine" isolées du lait de Vache possèdent des épitopes communs.

Les rendements en protéine obtenus lors de la chromatographie HPLC, nous permettent de conclure que la Fraction II-1 obtenue lors de la chromatographie FPLC, renferme 80 % de Protéine II-1-A et 20 % de Protéine II-1-B.

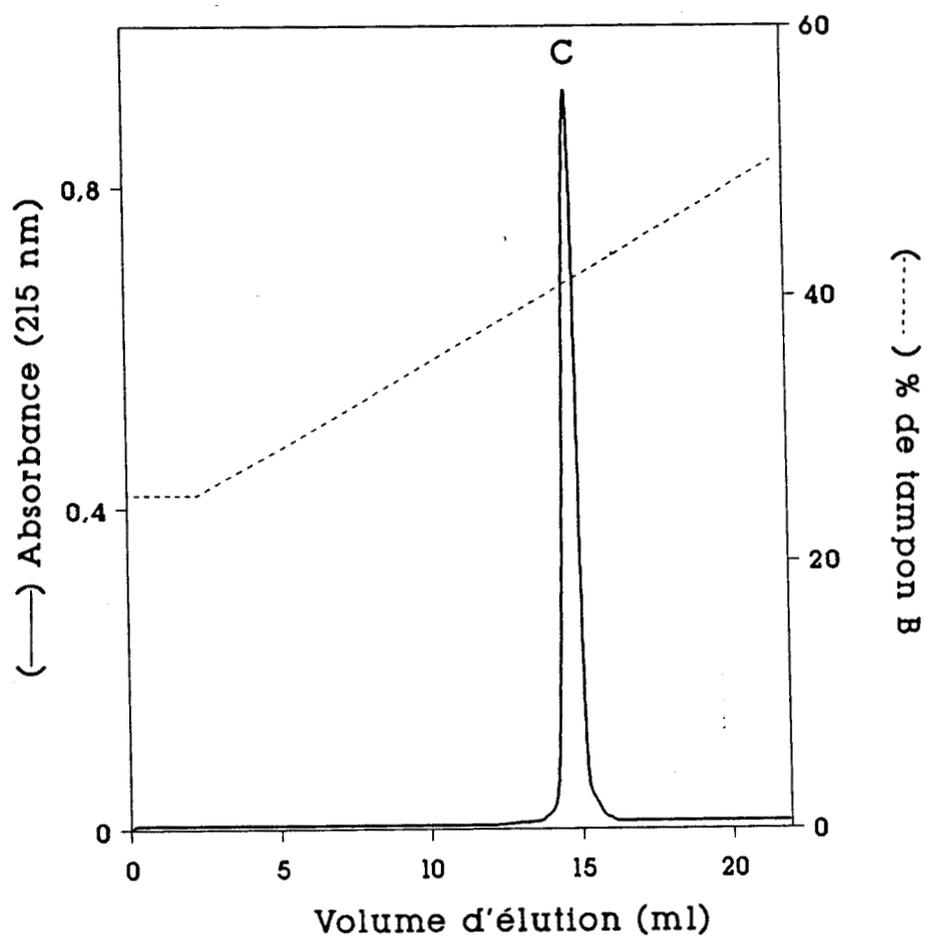
Le fractionnement de 20 l de lait de Vache permet donc de purifier 22,5 à 67,5 mg de ribonucléase et 7,5 à 22,5 mg de bis-angiogénine.

## 2 - Chromatographie de phase réverse de l'angiogénine

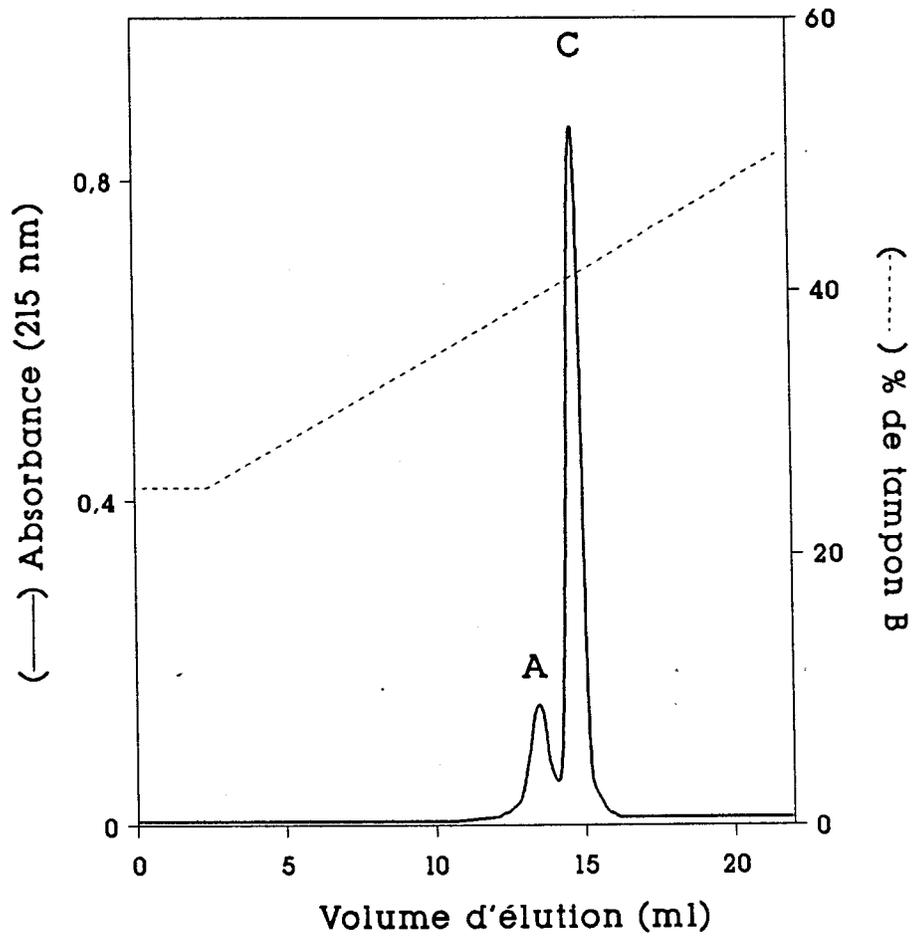
L'angiogénine présente dans la Fraction II-2 obtenue en FPLC est injectée sur une colonne Vydac C<sub>18</sub>, dans les conditions identiques à celles utilisées pour purifier la Fraction II-1. Comme le montre la Fig.19 (p.114), un seul produit est élué de la colonne.

Afin de s'assurer que l'angiogénine bovine ainsi purifiée n'est pas souillée de ribonucléase, nous avons ajouté à cette préparation 10 % de la Protéine II-1-A. Le chromatogramme obtenu après injection de ce mélange sur colonne Vydac C18 est présenté p.115 (Fig. 20). Les 10 % de ribonucléase sont bien élués avant l'angiogénine.

Nous montrons donc par là que l'activité ribonucléasique de l'angiogénine du lait de Vache décrite précédemment (Damart, 1989), est bien due à l'activité de cette angiogénine et non pas à une souillure de ribonucléase.



**Figure 19:** Chromatographie de phase réverse en HPLC sur colonne Vydac C<sub>18</sub>, de l'angiogénine du lait de Vache.



**Figure 20** : Chromatographie de phase réverse en HPLC sur colonne Vydac C<sub>18</sub>, de l'angiogénine (C) splémentée avec 10 % de ribonucléase (A) isolée du lait de Vache.

### C - CONCLUSION

Après modification du protocole de purification de l'angiogénine bovine (Fig. 21, p.117), nous avons montré que le lait de Vache renferme 1,5 à 4,5 mg d'angiogénine par litre (soit 5 à 10 fois plus que le premier protocole décrit par Daniel Damart). Le lait apparaît être une source plus riche en angiogénine que la plasma, puisque les concentrations de l'angiogénine détectées dans le plasma de Boeuf ne sont que de 80  $\mu\text{g/l}$  (Bond et Vallee, 1988).

Nous avons également montré qu'une nouvelle ribonucléase est copurifiée avec l'angiogénine. Les séquences de cette ribonucléase, qui ont été déterminées, possèdent une identité structurale totale avec la ribonucléase BL<sub>4</sub> du foie de Boeuf (Hofsteenge et al., 1989). La concentration de cette forme de ribonucléase est de l'ordre de 1 à 3 mg/l de lait.

Le fractionnement utilisé a permis de mettre en évidence une angiogénine éluée plus tôt lors de la chromatographie sur colonne Mono-S, c'est à dire en même temps que la ribonucléase. Nous avons nommé cette protéine "bis-angiogénine". En effet, l'analyse de sa séquence N-terminale a permis de l'identifier à l'angiogénine bovine, néanmoins, sa séquence primaire totale n'ayant pas été déterminée, nous ne pouvons que supposer qu'elle soit une angiogénine modifiée. Ceci peut être rapproché du cas de l'angiogénine isolée du plasma de Boeuf, en effet, un variant a été décrit, qui diffère de l'angiogénine par la perte d'un résidu His dans sa partie C-terminale (Bond et Vallee, 1988).

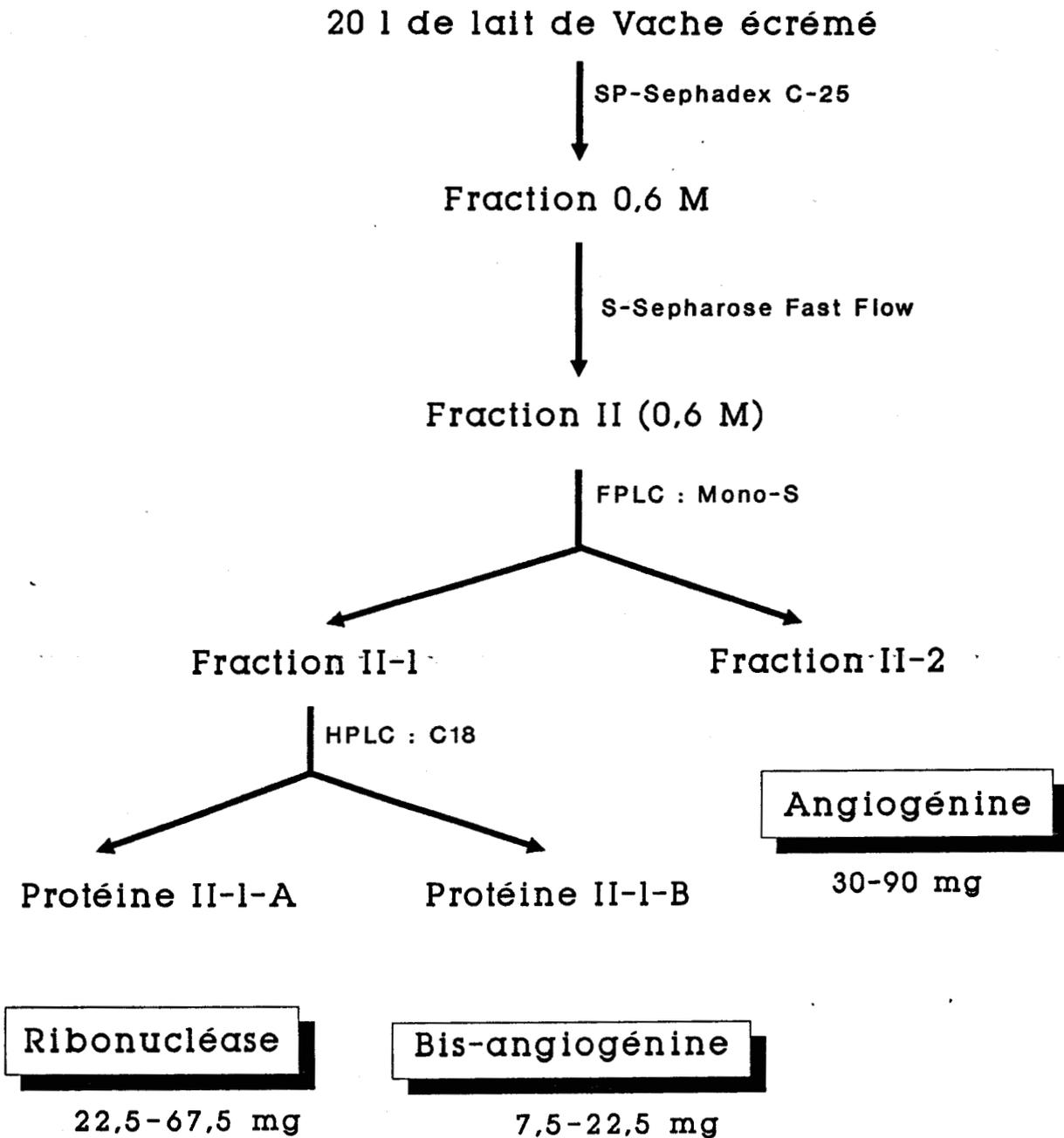


Figure 21 : Schéma de purification de 2 formes d'angiogénine ainsi que d'une ribonucléase, à partir du lait de Vache.

Enfin, nous avons montré que les antiséra que nous avons préparés sont dirigés spécifiquement contre l'angiogénine bovine. L'utilisation des antiséra nous a permis de mettre en évidence des réactions immunologiques croisées entre la bis-angiogénine et l'angiogénine. Par ailleurs, les antiséra ne reconnaissent ni la ribonucléase isolée du lait de Vache, ni la ribonucléase pancréatique A bovine. L'utilisation de ces antiséra nous permettra donc de suivre le protocole de purification de l'angiogénine mais aussi, de mettre facilement en évidence l'angiogénine dans d'autres milieux biologiques.

## II - ACTIVITE ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE ISOLEE DU LAIT DE VACHE

L'angiogénine fut tout d'abord mise en évidence dans les milieux de culture de cellules d'adénocarcinome humain et dans le plasma de sujets sains. Cette protéine fut en premier lieu caractérisée par son activité angiogénique, d'où le nom qui lui fut attribué. En effet, l'angiogénine humaine induit une angiogenèse à des concentrations bien plus faibles que celle obtenue avec les facteurs angiogéniques actuellement décrits.

Nous avons donc consacré ce chapitre, à la mise en évidence in vivo, de l'activité angiogénique de l'angiogénine du lait de Vache. Notre étude a d'abord été qualitative puis quantitative. Nous avons également comparer cette activité à celle de l'angiogénine humaine.

**A - PRINCIPE DE LA MISE EN EVIDENCE D'UNE  
ACTIVITE ANGIOGENIQUE IN VIVO**

Plusieurs modèles d'étude de l'angiogenèse in vivo ont été décrits. Nous avons choisi d'utiliser la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de Poulet (CAM), qui est le modèle actuellement le plus accessible, du point de vue de la technique et du prix de revient.

Le principe de ce modèle est simple. Le stimulus angiogénique est déposé sur la CAM à travers une fenêtre découpée dans la coquille. Lors d'une réponse angiogénique positive, les nouveaux capillaires sanguins se développent en direction du stimulus angiogénique déposé sur la membrane.

**B - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANGIOGENIQUE  
DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

La mise en évidence de l'activité de l'angiogénine bovine sur la CAM, n'a été au départ qu'une estimation visuelle. La technique demande une étude statistique très importante que nous n'avons pas pu réaliser.

En effet, l'angiogenèse induite par des concentrations importantes en angiogénine, de l'ordre de 50 à 500 ng par oeuf, est facilement visualisée, la croissance vasculaire est visible à l'oeil nu. Par contre, lorsque nous utilisons des concentrations plus faibles, l'angiogenèse est beaucoup moins visible, alors s'installe des problèmes d'appréciations, problèmes amplifiés par l'impossibilité de manipuler lors d'une expérience, une centaine d'oeufs par concentration en angiogénine.

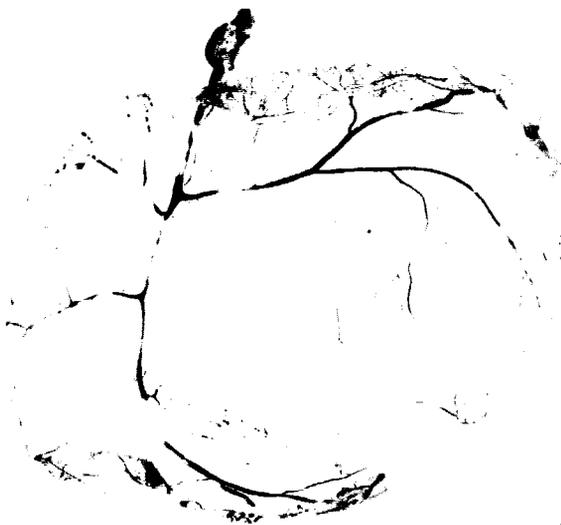
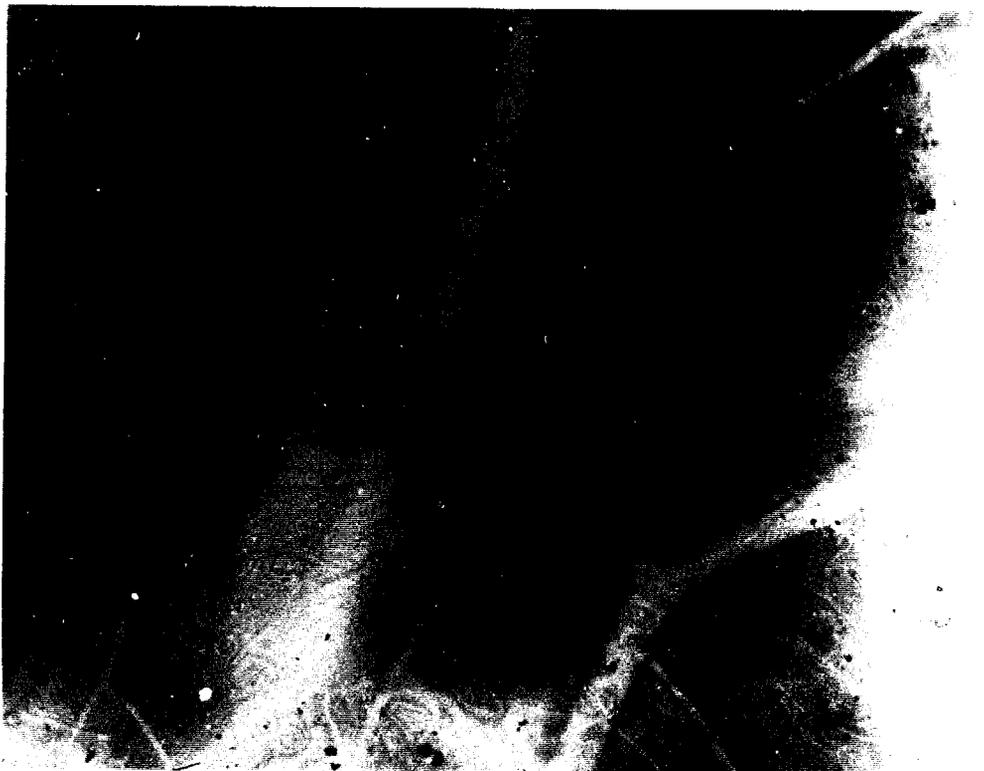
Nous avons cependant montré, par cette technique, que l'angiogénine isolée du lait de Vache induit l'angiogenèse dans la CAM de l'embryon de Poulet. Comme le montre la Fig. 22 (p.122), la croissance des vaisseaux est plus importante lorsque de l'angiogénine est déposée sur la pastille. Nous remarquons également, que les vaisseaux sanguins sont dirigés vers la pastille, c'est à dire en direction du stimulus angiogénique.

### **C - MESURE DE LA STIMULATION ANGIOGENIQUE** **INDUITE PAR L'ANGIOGENINE BOVINE**

La technique visuelle d'estimation de l'angiogenèse, nous a permis de montrer que l'angiogénine bovine induit la croissance des vaisseaux sanguins pour des doses supérieures ou égales à 5 ng/oeuf. En dessous de cette limite, aucun phénomène d'angiogenèse n'a pu être observé.

Sachant que l'angiogénine bovine plasmatique induit l'angiogenèse avec seulement 0,6 ng/oeuf (Bond et Vallee, 1988), les deux protéines étant absolument identiques sur le plan structural et physico-chimique, il nous a paru évident que la méthode utilisée n'était pas assez sensible. Pour cela, nous avons mis au point une méthode permettant de quantifier l'activité de l'angiogénine. Le principe de cette méthode repose sur l'incorporation de méthyl [ $H^3$ ]-thymidine dans la CAM, décrite dans le chapitre Matériels et Méthodes (p.87).

Les résultats (Fig. 23, p.123) obtenus par cette technique sont exprimés en % d'incorporation de radioactivité obtenus par stimulation de différentes concentrations en angiogénine bovine, après déduction de ceux obtenus avec des témoins négatifs (PBS).

**A****B1****B2**

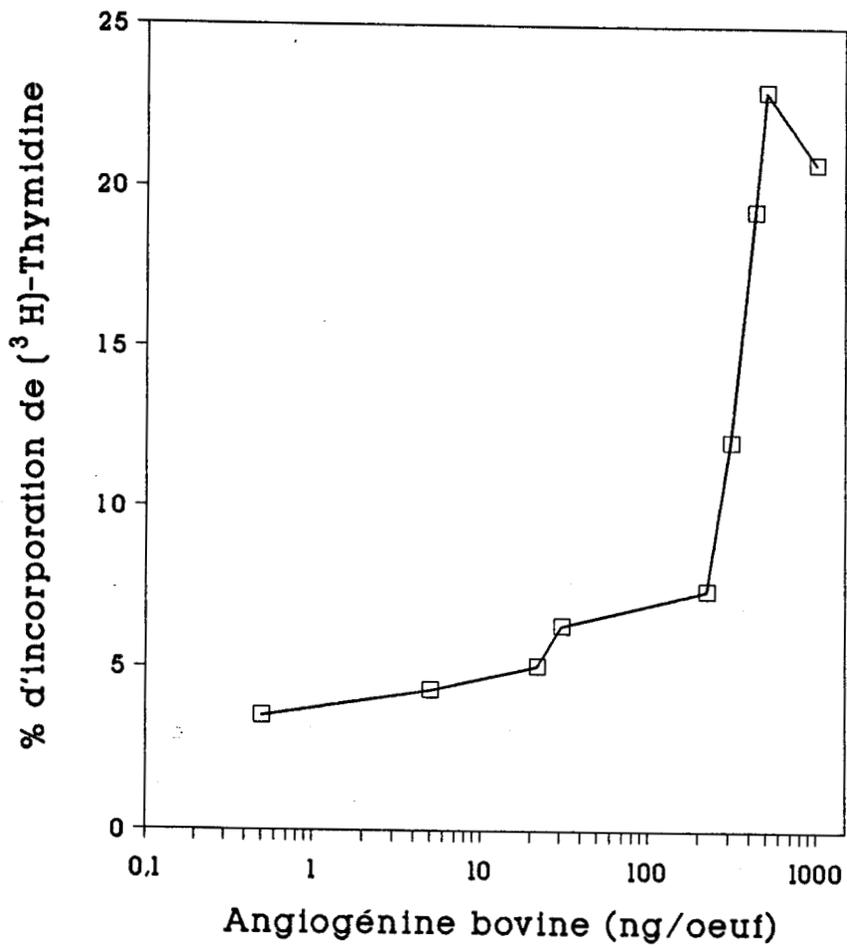
**Figure 22** : Angiogenèse de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de Poulet (observation sous microscope x 10).

**A** : Membrane contenant une pastille renfermant du PBS

**B** : Membrane contenant une pastille renfermant 50 ng d'angiogénine diluée dans le PBS

**B1** : Après extraction de la CAM sur plaque de verre

**B2** : In vivo



**Figure 23** : Détermination de l'incorporation de méthyl [ $H^3$ ]-thymidine dans la CAM, après stimulation par l'angiogénine bovine.

(Les % d'incorporation sont exprimés après déduction des témoins)

La technique quantitative utilisée ici, beaucoup plus sensible que la précédente, nous a permis de montrer que comme l'angiogénine du plasma de Boeuf, l'angiogénine du lait de Vache induit l'angiogenèse avec une quantité de l'ordre de 0,6 ng par oeuf.

#### **D - ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE** **ANGIOGENIQUE DE L'ANGIOGENINE**

L'évaluation quantitative de l'angiogenèse dans la CAM est une technique non seulement très sensible, mais elle nous paraît également très intéressante pour comparer des activités angiogéniques de facteurs différents.

##### **1 - Comparaison : angiogénine et ribonucléase** **du lait de Vache**

Nous avons vu précédemment, que l'angiogénine et la ribonucléase (Protéine II-1-A) sont copurifiées lors du fractionnement du lait de Vache par chromatographie d'échange de cations. Leurs séquences en acides aminés montrent un taux d'homologie important (Fig.17, p.110). Comme l'angiogénine possède une activité ribonucléasique, nous avons recherché l'activité angiogénique de cette ribonucléase.

Nous avons donc déterminé l'activité de ces deux protéines sur la CAM d'embryon de Poulet. Les résultats ont montré que quelque soit la concentration en ribonucléase déposée sur la CAM, aucune valeur d'incorporation de la radioactivité n'a été supérieure à celle obtenue avec les témoins PBS. La ribonucléase du lait de Vache ne possède pas d'activité angiogénique.

## 2 - Comparaison : angiogénines bovine et humaine recombinante

Nous avons voulu vérifier si les résultats quantitatifs de l'angiogenèse induite par l'angiogénine bovine étaient comparables à ceux obtenus avec d'autres angiogénines, notamment avec celle de l'angiogénine humaine recombinante.

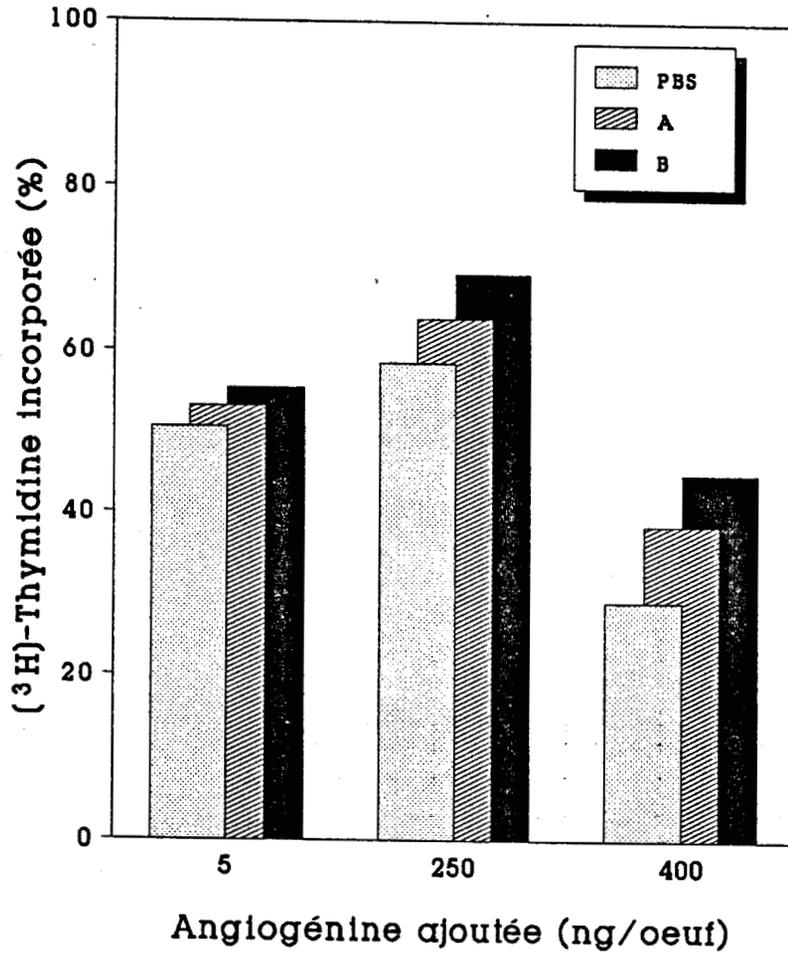
Les résultats obtenus représentés dans la Fig. 24 (p.126), montrent d'une part, que les % d'incorporation de la méthyl [ $H^3$ ]-thymidine obtenus dans les témoins (PBS) sont toujours inférieurs à ceux obtenus en présence d'angiogénine. L'incorporation de méthyl [ $H^3$ ]-thymidine est plus importante après stimulation par l'angiogénine humaine recombinante ou par l'angiogénine bovine.

Le tableau IV (p.127) montre que quelque soit les concentrations en angiogénine utilisées, l'angiogénine bovine induit toujours une stimulation un peu plus importante de l'angiogenèse obtenue en présence de l'angiogénine humaine recombinante, les % d'incorporations sont supérieurs de +2 à +6 %.

Nous avons donc montré, que pour une même concentration l'angiogénine du lait de Vache possède une activité angiogénique plus importante que celle de l'angiogénine recombinante humaine.

### E - CONCLUSION

L'activité angiogénique in vivo de l'angiogénine du lait de Vache a été vérifiée pour des doses variant de 0,6 à 1000 ng/oeuf. Les résultats obtenus, sont en accord, avec ceux de Bond et Vallee (1988).



**Figure 24** : Mesure de la stimulation angiogénique des angiogénines bovine et humaine, dans la CAM de l'embryon de Poulet.

**PBS** : Témoins PBS

**A** : Angiogénine humaine recombinante

**B** : Angiogénine bovine

**Tableau IV : Comparaison de l'activité angiogénique des angiogénines bovine et humaine.**

Incorporation de ( <sup>3</sup> H)-thymidine (%)	Angiogénine ajoutée en ng/œuf		
	5	250	400
I: Angiogénine bovine	55,4	69,4	44,95
II: Angiogénine humaine recombinante	53,25	64	38,5
I - II	+ 2,15	+ 5,23	+ 6,95

Si nous faisons un récapitulatif des valeurs de l'activité angiogénique des angiogénines décrites dans la littérature (Tableau V, p.129), nous remarquons que les angiogénines humaine et bovine possèdent des activités comparables (0,5 à 0,6 ng/oeuf). Ces protéines représentent les facteurs angiogéniques ayant le potentiel angiogénique le plus élevé décrit jusqu'alors dans la littérature.

Par contre, l'angiogénine humaine recombinante induit l'angiogénèse dans la CAM pour des concentrations de 2,5 ng/oeuf. Lors de notre étude comparative, nous avons montré que cette angiogénine stimule une angiogénèse sensiblement moins importante que celle induite par l'angiogénine bovine. En effet, pour une même dose, l'angiogénine bovine induit l'angiogénèse avec 2 à 6 % de plus que l'angiogénine recombinante humaine.

Récemment une angiogénine humaine a été synthétisée chimiquement (Kimura et al., 1990). Cette angiogénine possède in vivo une activité angiogénique révélée pour une concentration de 5 ng par oeuf.

Puisque les angiogénines naturelles, recombinante ou synthétique possèdent un potentiel angiogénique différent, l'étude comparée de leur structure, notamment tridimensionnelle, pourrait permettre d'expliquer ces différences et donc de localiser les régions impliquées dans cette activité.

Notons que dans la littérature, ce test de quantification n'a jamais été appliqué aux angiogénines.

**Tableau V : Activité angiogénique des angiogénines sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de Poulet**

Angiogénine	Dose minimale induisant l'angiogenèse dans la CAM (ng/oeuf)
Humaine (1)	0,5
Bovine (2)	0,6
Humaine (3) recombinante	2,5
Humaine (4) synthétique	5

1 : Fett et al. (1985); Shapiro et al. (1987)

2 : Bond et Vallee (1988); résultats personnels

3 : Deneffle et al. (1987)

4 : Kimura et al. (1990)

### III - ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE

Deux types de modèles sont utilisés pour étudier l'angiogenèse: les modèles in vivo et in vitro, comme nous l'avons mentionné (p.19) auparavant, l'activité des facteurs angiogéniques doit toujours être vérifiée dans les deux cas.

Précédemment, nous avons vérifié l'activité de l'angiogénine in vivo sur la CAM de l'embryon de Poulet. Dans un deuxième temps, nous avons recherché une activité de l'angiogénine sur le modèle d'étude de l'angiogenèse in vitro, c'est à dire sur les cellules endothéliales en culture. Nous pouvons rappeler que dans la littérature, l'angiogénine est décrite comme un facteur non mitogène.

L'étude de l'angiogenèse sur les cultures de cellules endothéliales permet d'analyser, étape par étape, la séquence d'événements permettant la croissance d'un nouveau capillaire sanguin. Parmi ces différentes étapes, nous avons choisi l'étude de la croissance cellulaire. Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence une activité mitogène de l'angiogénine bovine vis-à-vis des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf.

**A - MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE MITOGENE**  
**DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

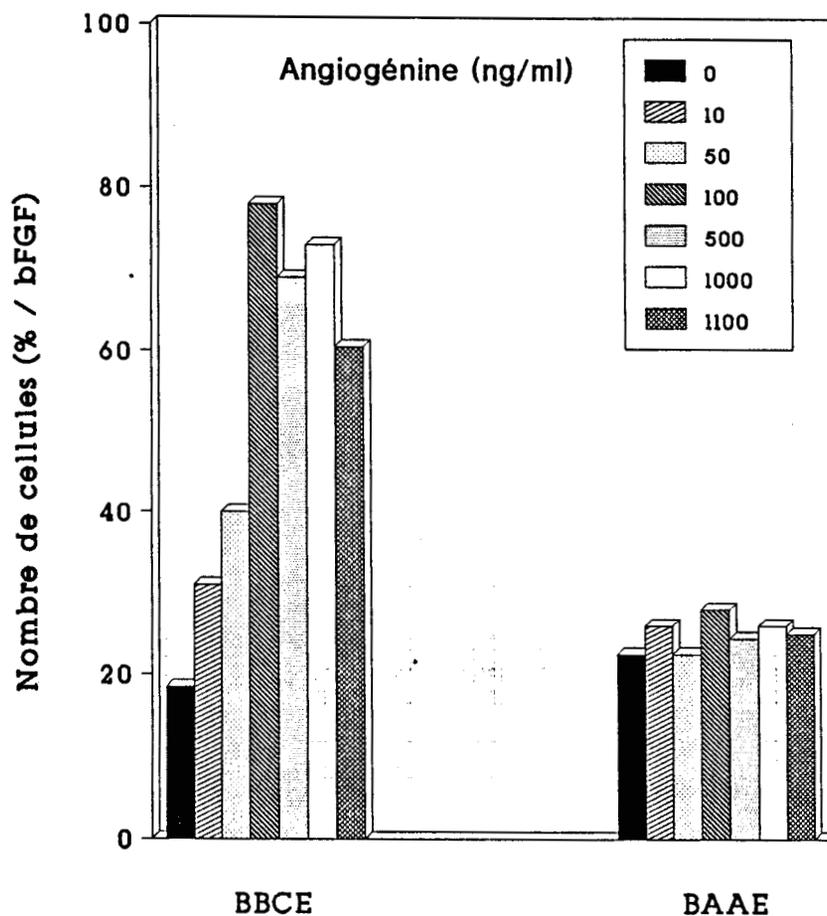
La recherche d'une éventuelle activité mitogène de l'angiogénine bovine a été réalisée sur deux types cellulaires, tout d'abord sur des cellules endothéliales, cellules cibles de la plupart des facteurs angiogéniques, puis sur des fibroblastes.

L'activité a dans un premier temps, été mise en évidence par simple numération cellulaire, puis vérifiée par mesure de la synthèse d'ADN dans les mêmes cellules (techniques décrites p.91-93).

Les cellules endothéliales, que ce soit les cellules BBCE (cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf) ou BAAE (cellules endothéliales d'aorte de Boeuf), sont cultivées dans un milieu supplémenté en sérum mais aussi en bFGF (1 ng/ml). Donc, dans un premier temps, nous avons tout simplement remplacé le bFGF par l'angiogénine dans ces cultures, afin de déterminer si l'angiogénine possédait une activité mitogène.

Les résultats obtenus après numération cellulaire, sont représentés dans la Fig. 25 (p.132). Ainsi, nous avons montré que l'angiogénine bovine induit la prolifération des cellules BBCE, la croissance maximale des cellules étant obtenue avec 100 ng d'angiogénine par ml de milieu de culture. Les résultats montrent cependant que dans les mêmes conditions, l'angiogénine bovine ne possède aucune activité vis-à-vis de la croissance des cellules BAAE et cela, quelque soit la concentration utilisée.

La même recherche a été réalisée sur un autre type cellulaire, les fibroblastes CCL39, les résultats obtenus ont été également négatifs.

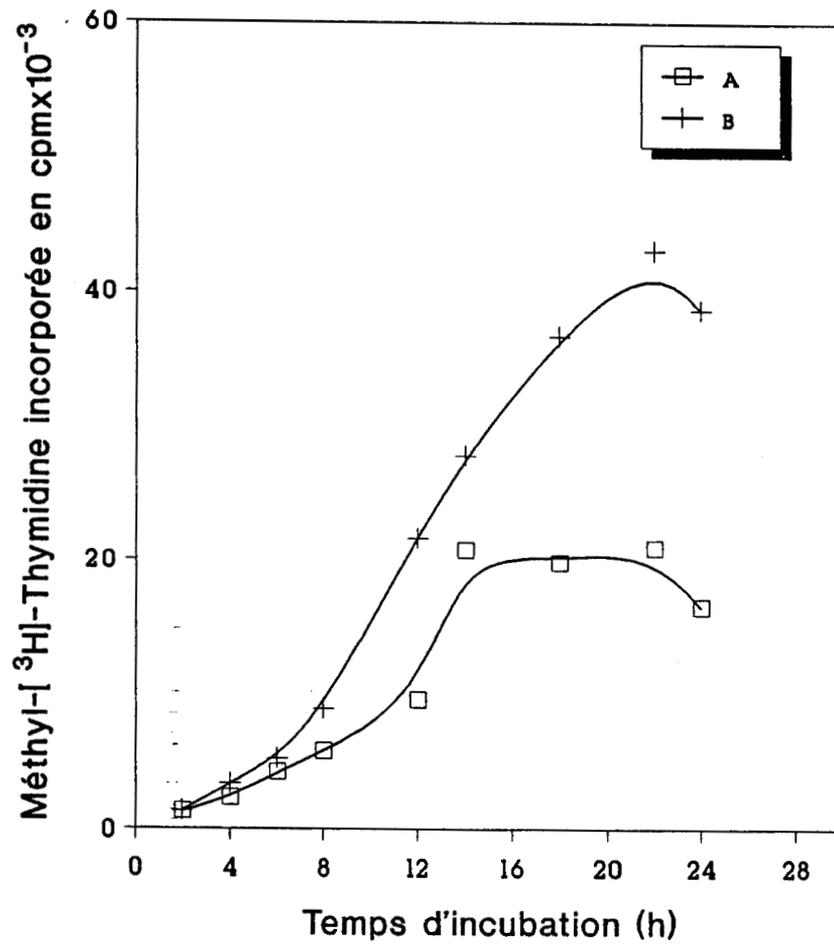


**Figure 25** : Etude de la prolifération des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE) et des cellules endothéliales d'aorte de Boeuf (BAAE), en fonction de la concentration en angiogénine bovine. Le 100 % correspond à 486 000 cellules/puits pour les BBCE et à 410 000 cellules/puits pour les BAAE. Le 100 % est obtenu en présence de 1 ng/ml de bFGF.

Au Laboratoire, un test de mesure de l'incorporation de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine dans les cellules CCL39 est couramment utilisé pour rechercher une activité facteur de croissance. En utilisant cette méthodologie, nous avons vérifié les résultats obtenus par numération cellulaire, notamment que l'angiogénine bovine ne possède aucune activité sur la croissance des fibroblastes CCL39.

Par contre, pour vérifier les résultats obtenus avec les cellules BBCE, nous avons dû mettre au point une technique de mesure de l'incorporation de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine dans ces cellules. En effet, le test appliqué aux cellules CCL39 confluentes, ne s'applique pas aux cellules endothéliales confluentes incapables de rentrer à nouveau en phase de synthèse. Le test a donc été réalisé en cours de la croissance en diminuant progressivement le taux de sérum dans le milieu de culture afin d'arrêter la croissance des cellules en phase G<sub>0</sub>, puis de les restimuler par de l'angiogénine afin de les amener en phase de synthèse. La Fig. 26 (p.134) représente la mesure de la synthèse d'ADN des cellules BBCE après stimulation par l'angiogénine bovine. L'incorporation méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine maximale est obtenue 20 à 22 h après ajout de 100 ng d'angiogénine bovine/ml de milieu de culture.

Les résultats montrent donc que l'angiogénine bovine possède une activité mitogène vis-à-vis des cellules BBCE. De nombreux auteurs tels que Folkman et Klagsbrun (1987a) ou Heath et al. (1989) ont décrit l'angiogénine comme ne possédant aucune activité sur la croissance des cellules. Les résultats obtenus par ces auteurs peuvent sans doute être expliqués par la méthode utilisée pour la préparation des capillaires. En fait, la plupart des préparations de microvaisseaux sont réalisées par digestion par la collagénase (Joo F., 1985). L'utilisation de la



**Figure 26 :** Stimulation de la synthèse d'ADN des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE) par l'angiogénine bovine.

**A :** cellules non stimulées

**B :** cellules stimulées par 100 ng/ml d'angiogénine

collagénase est cependant susceptible d'entraîner la contamination des capillaires par d'autres types cellulaires. Les résultats obtenus sont alors erronés puisque les cellules endothéliales de larges vaisseaux et de capillaires possèdent des propriétés très différentes en réponse à différents stimuli (Zetter, 1980, 1988; Folkman et al., 1979). Les cellules de capillaires que nous utilisons sont préparées selon un protocole qui ne fait appel à aucune enzyme, excluant ainsi la possibilité de contamination par d'autres types cellulaires (Méresse et al., 1989).

Il est intéressant de comparer nos résultats avec ceux de Keegan et al. (1982) qui ont montré qui in vitro, le TAF (tumor angiogenesis factor), induit la croissance des cellules endothéliales de capillaires mais pas des celles de l'aorte. Comme, il a été montré qu' in vivo (Zagzag et al., 1989), la croissance d'une tumeur est tout d'abord dépendante de la prolifération des capillaires. L'existence d'une nouvelle famille de facteurs angiogéniques qui contrairement aux autres facteurs angiogéniques sont spécifiques des cellules endothéliales de capillaires paraît être d'une importance capitale dans les recherches orientées sur le traitement des tumeurs.

## **B - INHIBITION DE L'ACTIVITE MITOGENE DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

Le PRI (Placental Ribonuclease Inhibitor) inhibe les activités enzymatique et angiogénique de l'angiogénine (Shapiro et Vallee, 1987; Lee et Vallee, 1989b; Lee et al., 1989a). Nous avons donc voulu vérifier si ce facteur inhibait également son activité mitogène. Le protocole de numération cellulaire utilisée est celui décrit p.91.

En effet, comme la montre la Fig. 27 (p.137), lorsque le PRI et l'angiogénine sont ajoutés en quantité stoechiométrique (7 nM de chaque) dans le milieu de culture des cellules BBCE, l'activité mitogène de l'angiogénine est diminuée de 60 %. Le PRI inhibe également l'activité mitogène de l'angiogénine bovine.

### **C - ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE MITOGENE** **DE L'ANGIOGENINE BOVINE**

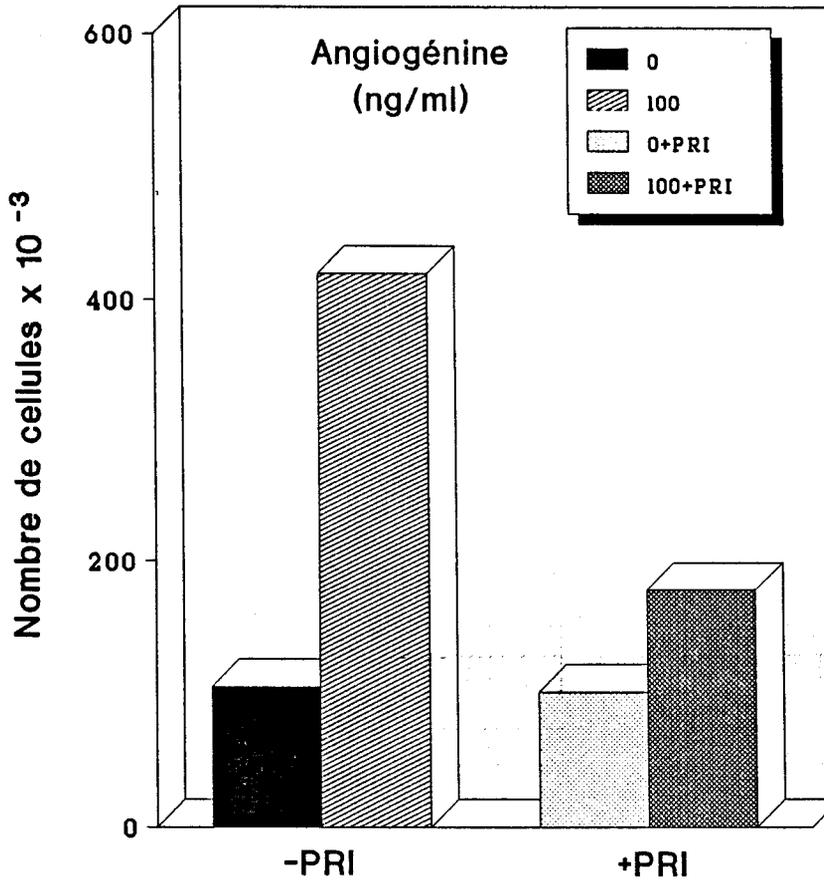
#### **1 - Etude comparative avec le facteur de croissance** **fibroblastique**

Les expériences de numération cellulaire sur les cellules BBCE, BAAE ainsi que sur les fibroblastes CCL39 ont été réalisées en présence de concentrations variables d'angiogénine et de bFGF.

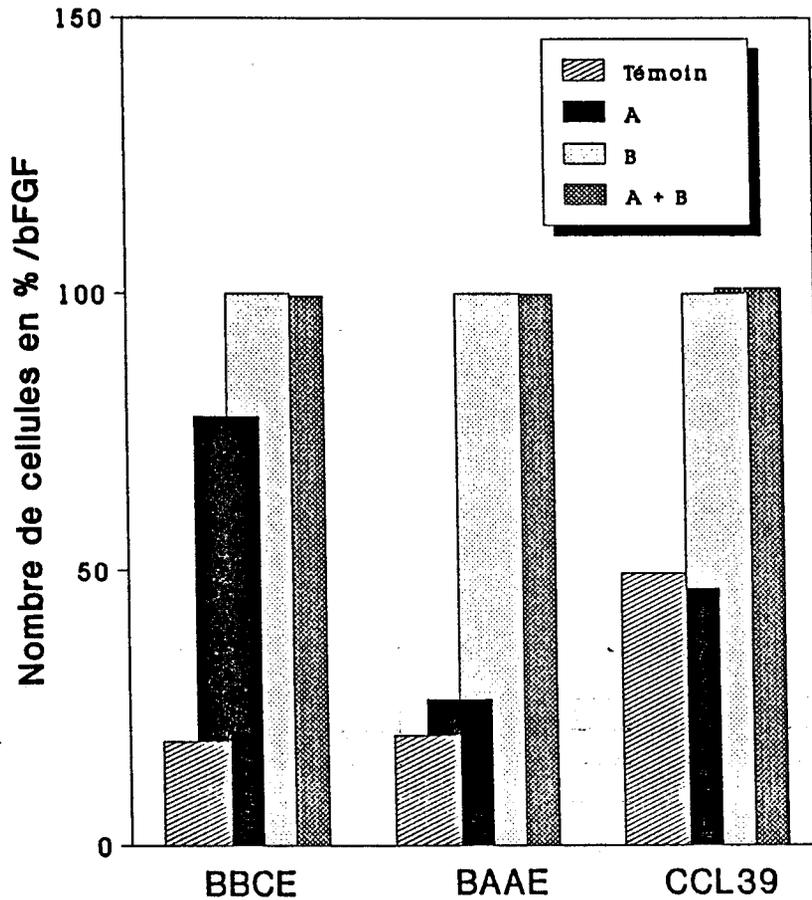
Les résultats représentés dans la Fig. 28 (p.138) montrent, tout d'abord, que le bFGF est un facteur de croissance pour ces 3 types cellulaires. Ce facteur angiogénique ne possède aucune spécificité d'action, alors que l'angiogénine bovine possède une activité très spécifique sur des cellules endothéliales de capillaires.

D'autre part, lorsque nous incubons l'angiogénine (100 ng/ml) et le bFGF (1 ng/ml) ensemble dans le milieu de culture, nous n'observons aucune synergie d'activité entre les deux facteurs. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Fett et al. (1987) sur la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet.

Nous pouvons dire que l'angiogénine et le bFGF possèdent sur les cellules endothéliales de capillaires des récepteurs différents. En effet,



**Figure 27** : Inhibition de l'activité mitogène de l'angiogénine bovine par l'inhibiteur placentaire des ribonucléases (PRI).



**Figure 28** : Activité mitogène de l'angiogénine bovine comparée à celle du facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF), vis-à-vis de différents types cellulaires

**BBCE** : Cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf  
**BAAE** : Cellules endothéliales d'aorte de Boeuf  
**CCL39** : Fibroblastes de poumon de Hamster chinois

**Témoin** : Culture dans un milieu minimum  
**A** : Culture en présence de 100 ng/ml d'angiogénine bovine  
**B** : Culture en présence de 1 ng/ml de bFGF

le récepteur du bFGF est présent à la surface des 3 types cellulaires étudiés, son activité mitogène est transduite à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de ce récepteur, alors que l'angiogénine n'est active que vis-à-vis des cellules BBCE, et de plus, elle n'intervient pas dans le processus d'interaction du bFGF avec son récepteur quelque soit le type cellulaire étudié, puisque l'activité mitogène de bFGF reste la même.

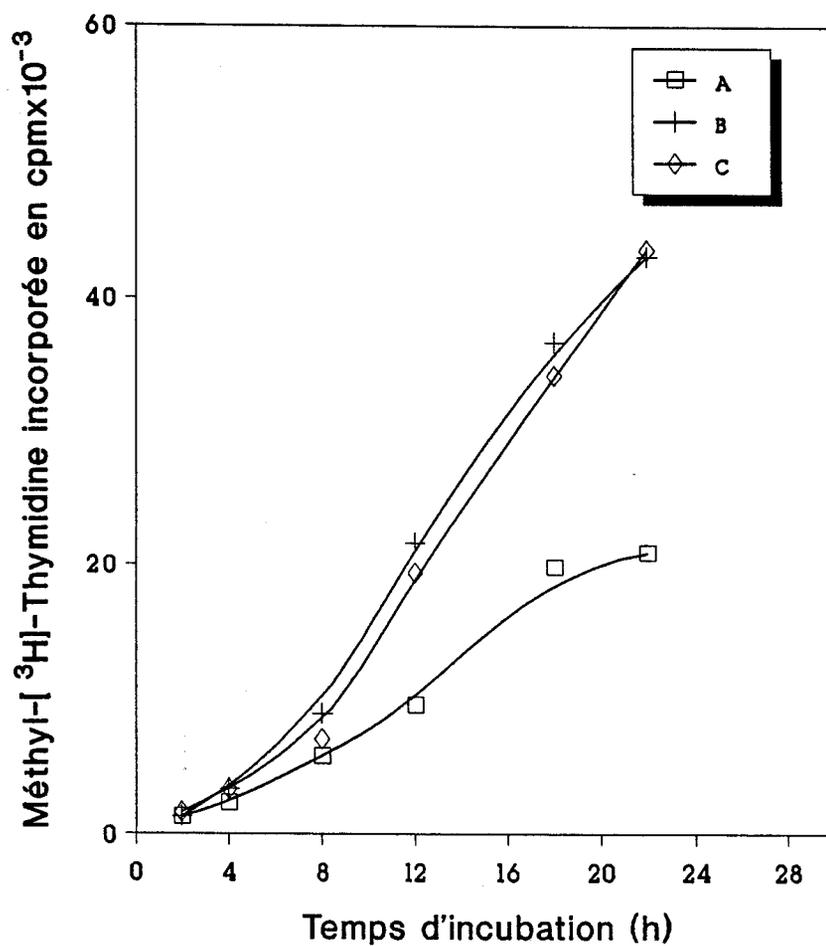
Les deux activités mitogènes ont également été étudiées par mesure de l'incorporation de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine dans les cellules BBCE. Comme le montre la Fig. 29 (p.140), les résultats obtenus sont comparables à ceux de l'angiogénine bovine et du bFGF. La stimulation de la synthèse d'ADN est identique lorsque les cellules sont stimulées avec l'angiogénine et le bFGF.

## 2 - Etude comparative avec l'angiogénine humaine recombinante

Nous avons vérifié si l'angiogénine humaine recombinante possédait la même activité mitogène que l'angiogénine du lait de Vache.

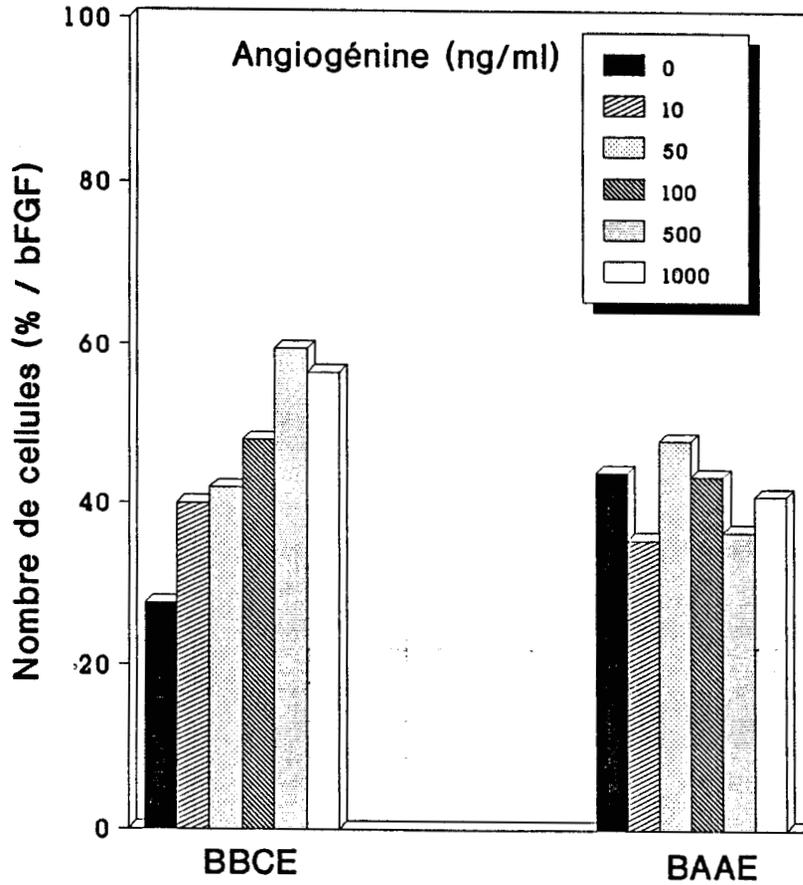
Les expériences de numération cellulaire sur les cellules BBCE et BAAE ont été réalisées dans les mêmes conditions qu'avec l'angiogénine bovine. Les résultats présentés dans la Fig. 30 (p.141) montrent qu'effectivement, cette angiogénine possède une activité mitogène vis-à-vis des cellules BBCE, et que comme l'angiogénine bovine elle est inactive envers les cellules BAAE.

Néanmoins, si nous comparons l'activité de ces 2 protéines, aux mêmes concentrations (Fig.31, p.142), nous remarquons que la



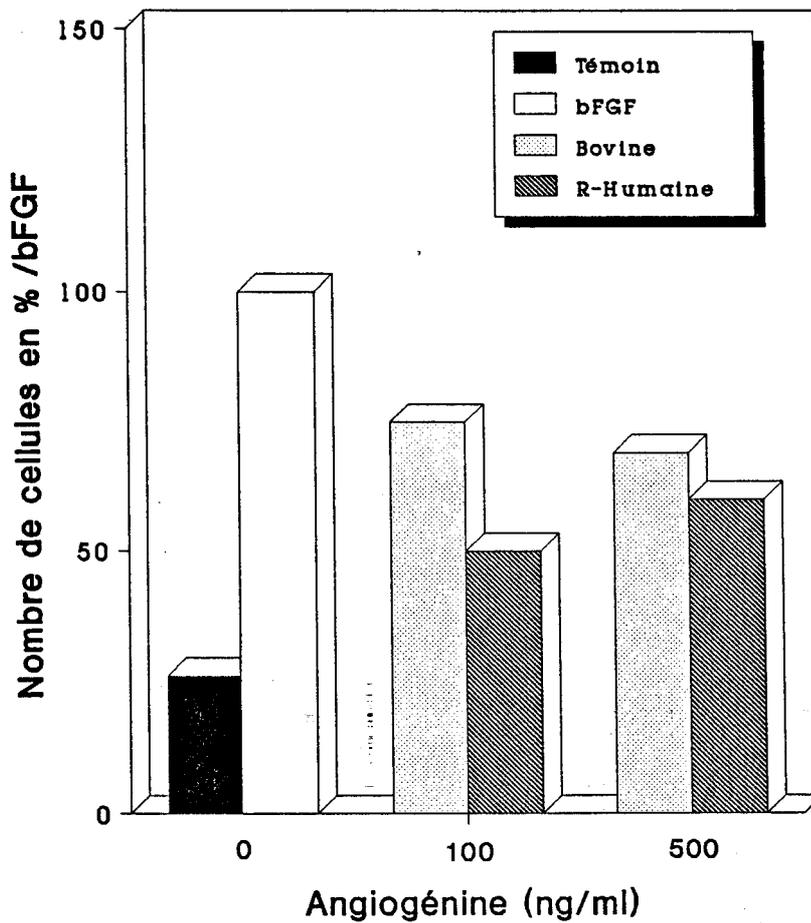
**Figure 29** : Cinétique d'incorporation de méthyl-[<sup>3</sup>H]-thymidine par les BBCE.

- A** : Cellules non stimulées
- B** : Cellules quiescentes stimulées par 100 ng/ml d'angiogénine
- C** : Cellules quiescentes stimulées par 1 ng/ml de bFGF



**Figure 30 :** Effet de différentes concentrations en angiogénine humaine recombinante sur la prolifération des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE) et des cellules endothéliales d'aorte de Boeuf (BAAE).

Le 100 % (1 ng/ml de bFGF) correspond à 439 000 cellules/puits pour les BBCE et 490 000 cellules/puits pour les BAAE.



**Figure 31** : Comparaison des activités mitogènes des angiogénines bovine et recombinante humaine (R-humaine) vis-à-vis des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf (BBCE).

**Témoins** : culture en milieu minimum

**bFGF** : 1 ng/ml

concentration pour laquelle l'angiogénine bovine stimule une croissance maximale des cellules endothéliales est de 100 ng/ml de milieu de culture, alors que pour l'angiogénine humaine recombinante cette concentration est de 500 ng/ml.

De plus, l'activité maximale de l'angiogénine bovine (100 ng/ml) représente 75 % du nombre de cellules obtenues avec le témoin positif (bFGF: 1 ng/ml), alors que l'activité maximale de l'angiogénine humaine recombinante (500 ng/ml) ne représente que 60 % de celui-ci.

L'angiogénine humaine recombinante semble posséder donc une activité mitogène plus faible que celle de l'angiogénine bovine, ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature mais aussi avec les résultats que nous avons obtenus dans notre étude de l'activité angiogénique de ces deux protéines, c'est à dire une activité toujours plus faible pour la protéine recombinante. Néanmoins, nous nous devons de mentionner que l'angiogénine recombinante humaine ne provenait pas d'une préparation récente, ces résultats restent donc à être vérifiés.

#### D - CONCLUSION

Pour la première fois, nous avons décrit une activité mitogène de l'angiogénine. Cette activité est très spécifique puisqu'elle ne s'exprime que vis-à-vis des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, contrairement à celle d'un autre facteur angiogénique tel que le bFGF qui lui possède une activité facteur de croissance quelque soit le type cellulaire étudié.

Sachant que l'angiogenèse se développe uniquement à partir de capillaires, ces résultats montrent que l'angiogénine joue un rôle très précis lors du processus d'angiogenèse.

Nous avons également montré que la croissance maximale des cellules est obtenue avec une concentration de 100 ng d'angiogénine bovine par ml de milieu de culture et que celle-ci était inhibée par le PRI dans des conditions de réaction stoechiométrique.

Enfin, nous avons montré que l'angiogénine humaine recombinante possédait la même activité mitogène spécifique des cellules de capillaires, bien que cette activité semble être plus faible comparée à celle de l'angiogénine du lait de Vache. La préparation de cette angiogénine humaine recombinante étant assez vieille, les résultats restent à être vérifier.

Ces résultats ont été décrits dans Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:833-839.

#### IV - CARACTERISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES

Précédemment, nous avons montré que l'angiogénine possède une activité mitogène in vitro sur les cellules BBCE, alors qu'elle ne présente pas cette activité envers d'autres types cellulaires telles que les BAAE. Nous avons donc pensé que cette différence d'activité entre les cellules de gros vaisseaux et de capillaires, pouvait être dû à la présence de récepteurs spécifiques de l'angiogénine présents uniquement à la surface des cellules BBCE.

Dans ce chapitre, nous présentons les résultats qui vérifient cette hypothèse. Au cours de notre étude, nous avons caractérisé d'une part, les paramètres de fixation de l'angiogénine, et d'autre part, préciser la masse moléculaire du récepteur de l'angiogénine présent à la surface des cellules BBCE.

**A - MISE EN EVIDENCE DU RECEPTEUR DE**  
**L'ANGIOGENINE SUR LES BBCE**

1 - Cinétique de fixation spécifique de [<sup>125</sup>I]-angiogénine

Dans une étude parallèle sur 3 types cellulaires: les cellules endothéliales BBCE et BAAE et les fibroblastes CCl39, nous avons, tout d'abord, réalisé une cinétique de fixation de l'angiogénine (technique décrite p.96).

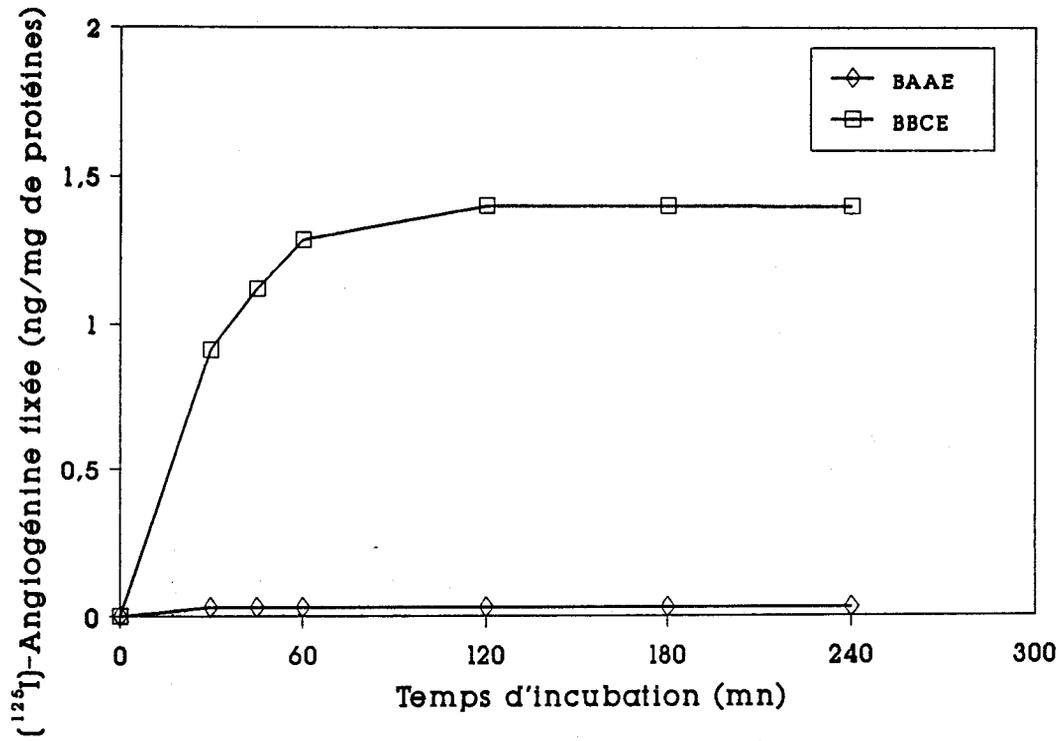
Les cellules sont incubées à 4°C avec une concentration constante en [<sup>125</sup>I]-angiogénine (15 ng/ml), la radioactivité associée aux cellules est ensuite déterminée à différents temps d'incubation.

Les résultats obtenus (Fig. 32, p.147) montrent que l'angiogénine se fixe sur les cellules BBCE, l'équilibre de fixation spécifique est atteint au bout de 2 h d'incubation à 4°C. Lors de cette cinétique, réalisée dans les mêmes conditions, nous n'avons observé aucune radioactivité associée aux cellules BAAE et CCl39. L'angiogénine ne se fixe que sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf.

2 - Etude de la fixation spécifique de [<sup>125</sup>I]-angiogénine  
sur les BBCE

a - Dosage par saturation

Différentes concentrations en [<sup>125</sup>I]-angiogénine (0-20 ng/ml) sont incubées avec les cellules BBCE. La radioactivité spécifique associée aux cellules est déterminée au bout de 2 h d'incubation à 4°C.



**Figure 32** : Cinétique de fixation spécifique de [<sup>125</sup>I]-angioténine sur les BBCE et les BAAE à 4°C.

[<sup>125</sup>I]-angioténine : 15 ng/ml de milieu de culture

La courbe de fixation de [ $^{125}$ I]-angiogénine ainsi obtenue (Fig. 33 A, p.149) montre que la fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules BBCE est saturable. L'angiogénine interagit donc avec la surface cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique. La saturation est obtenue avec seulement 15 ng d'angiogénine bovine/ml de milieu d'incubation (1 nM).

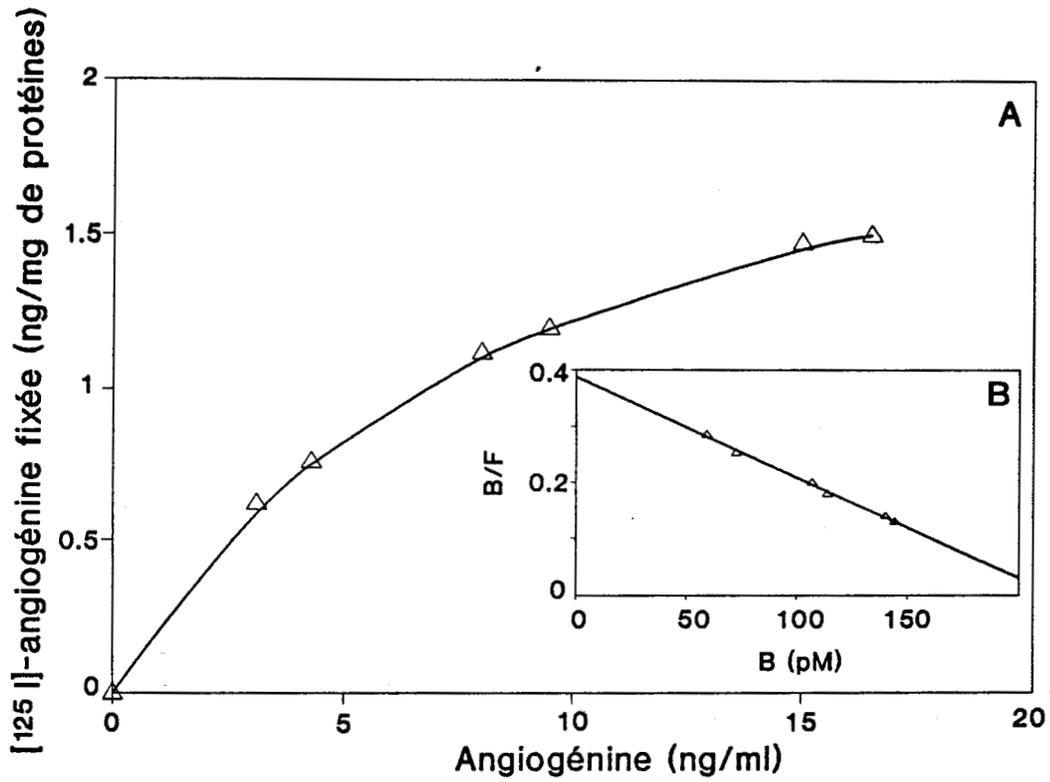
#### b - Représentation de Scatchard

L'analyse des résultats selon la représentation de Scatchard (1949) (Fig. 33 B, p.149) montre l'existence d'une seule classe de sites de fixation de l'angiogénine sur les cellules BBCE. Ces sites de fixation sont de haute affinité puisque la constante de dissociation calculée est de  $5 \times 10^{-10}$  M, pour un nombre de sites de 11.000 par cellule.

Les paramètres de fixation spécifique de l'angiogénine ainsi décrits sont en accord avec ceux décrit par Hu et al. (1991). La constante de dissociation de l'angiogénine vis-à-vis des cellules endothéliales d'artère pulmonaire de Boeuf, décrite par ces auteurs est de  $5 \times 10^{-10}$  M. Par contre, Badet et al. (1989) lors de l'analyse de la fixation de l'angiogénine sur les cellules endothéliales d'artère pulmonaire de Boeuf, montrent, l'existence de deux classes de sites, des sites de haute affinité ( $5 \times 10^{-9}$  M) pour 900.000 sites/cellule et des sites de faible affinité ( $2 \times 10^{-6}$  M).

#### c - Spécificité de la fixation de l'angiogénine

Nous avons montré précédemment que l'angiogénine bovine possédait 35 % d'identité structurale avec la ribonucléase pancréatique A



**Figure 33 :** Fixation spécifique de  $[^{125}\text{I}]$ -angiotensine sur les BBCE.

**A :** Courbe de fixation spécifique

**B :** Représentation de Scatchard

L'incubation est réalisée à  $4^\circ\text{C}$  pendant 2 h.

bovine (RNase A) et que ces deux protéines possédaient un pHi très basique (>9,5) (Fett et al., 1985). Afin de s'assurer que la fixation de l'angiogénine sur les cellules BBCE n'est pas dû à des interactions ioniques, nous avons réalisé les mêmes expériences de fixation avec [<sup>125</sup>I]-RNase A. Les résultats ont montré que dans les mêmes conditions de fixation, la [<sup>125</sup>I]-RNase A ne présente aucune interaction avec les cellules BBCE.

La fixation spécifique de l'angiogénine bovine sur les cellules endothéliales de capillaire est bien une interaction spécifique avec son récepteur, les propriétés basiques de la protéine n'en sont pas responsables.

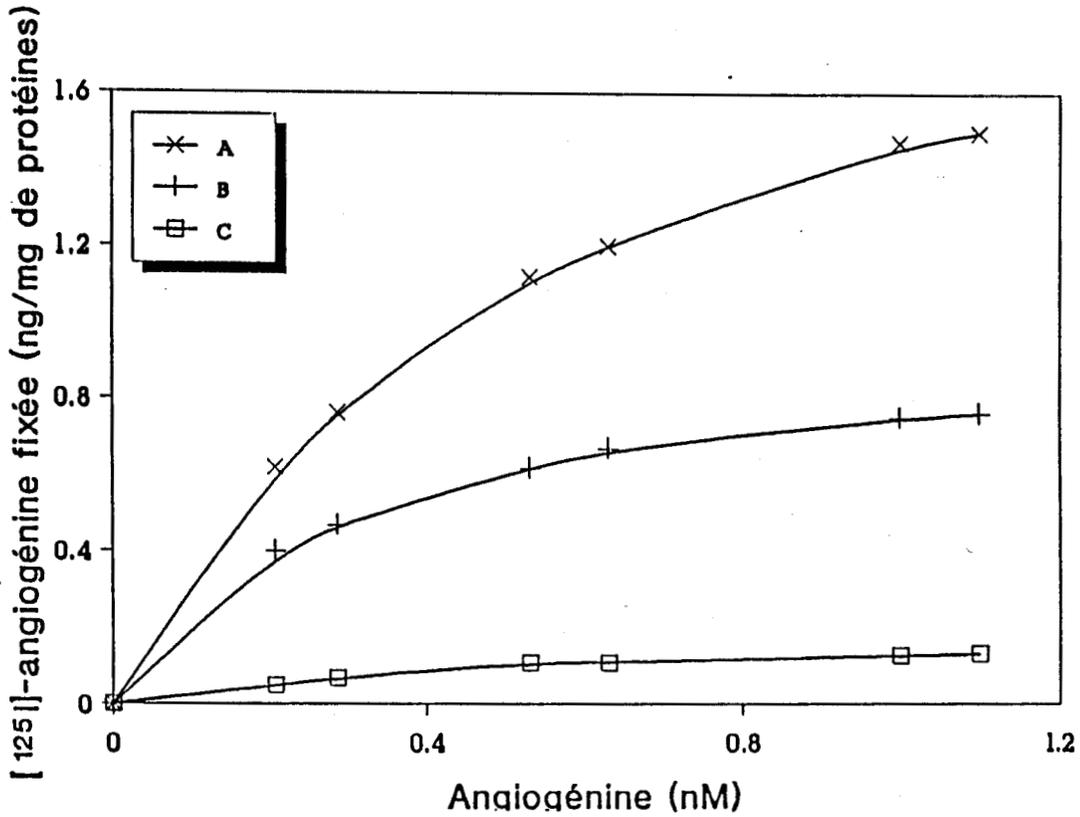
Badet et al. (1989) ont également obtenu les mêmes résultats, alors que Hu et al. (1991) décrivent l'existence d'une compétition entre l'angiogénine et la RNase A vis-à-vis du récepteur de l'angiogénine sur les cellules endothéliales d'artère pulmonaire de Boeuf.

## **B - PARAMETRES INFLUENÇANT LA FIXATION DE L'ANGIOGENINE SUR LES CELLULES BBCE**

### **1 - Influence de la densité cellulaire sur la fixation spécifique de l'angiogénine**

Nous avons dosé par saturation, la fixation spécifique de l' [<sup>125</sup>I]-angiogénine sur les cellules BBCE à différentes stades de la culture: 5 jours (cellules éparses), 7 jours (cellules subconfluentes) et 9 jours (cellules confluentes).

Les courbes de fixation spécifique obtenues (Fig. 34, p.151) montrent une fixation saturable quelque soit la densité cellulaire étudiée.



**Figure 34** : Fixation spécifique de [ $^{125}$ I]-angiogénine sur les BBCE en fonction de la durée de la culture.

**A** : BBCE éparses (3 jours)

**B** : BBCE subconfluentes (7 jours)

**C** : BBCE confluentes (9 jours)

**Tableau VI** : Influence de la densité cellulaire sur le nombre de sites de fixation spécifique de l'angiogénine sur les BBCE

Temps de culture en jours	Nombre de sites/cellule
5	11.000
7	5.000
9	900

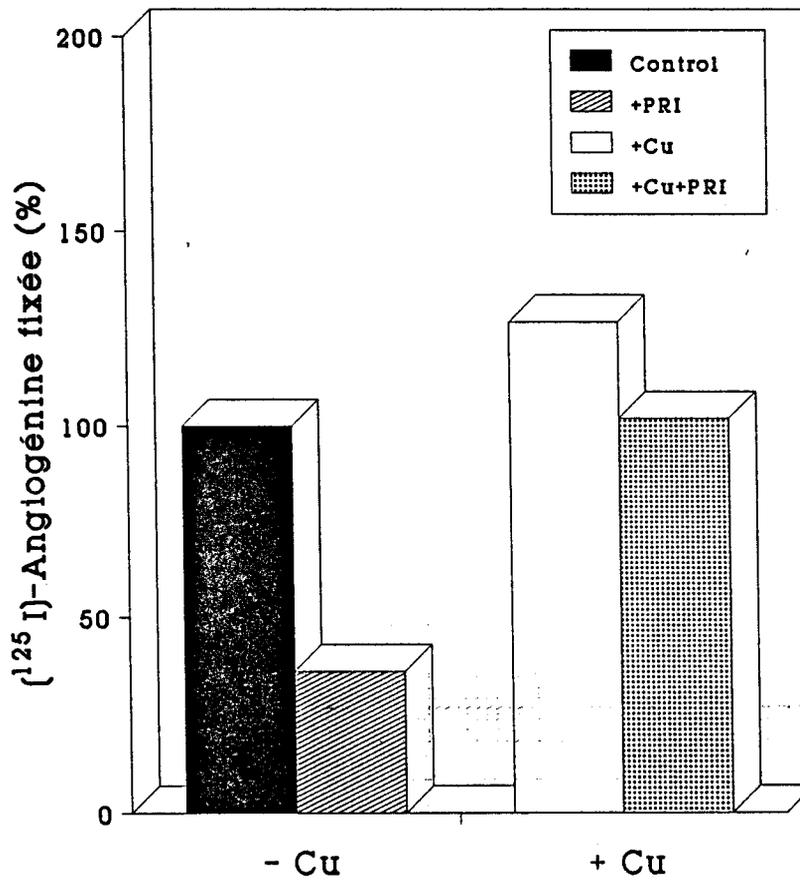
Dans le tableau VI (p.151) sont regroupés les paramètres de fixation obtenus d'après les représentations de Scatchard des courbes de fixation précédentes. Ces résultats montrent que plus la densité cellulaire augmente (5, 7 et 9 jours de culture) plus le nombre de sites de fixation de l'angiogénine diminue (11.000, 5.000, 880 sites/cellule, respectivement). La régulation des récepteurs par la densité cellulaire a souvent été observée pour de nombreux facteurs de croissance tel que le FGF (Neufeld et Gospodarowicz, 1985) ou le TGF  $\beta$  (Rizzino et al., 1988). Cette régulation est considérée comme étant le reflet de l'implication de ces facteurs dans les fonctions intervenant lors de la croissance cellulaire.

Nous pouvons également noter, que lors de nos expériences de fixation, quelque soit la densité cellulaire, les cellules BAAE ne fixent pas l'angiogénine.

## 2 - Inhibition de la fixation de l'angiogénine par le PRI

L'inhibiteur placentaire des ribonucléases (PRI) inhibe les activités enzymatique et angiogénique de l'angiogénine (Shapiro et Vallee, 1987). Dans le chapitre précédent (p.135) nous avons montré que le PRI inhibe aussi l'activité mitogène de l'angiogénine vis-à-vis des cellules BBCE.

Lors de l'étude de la fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules BBCE, nous avons également réussi à inhiber la fixation de l'angiogénine par le PRI. Comme le montre la Fig.35 (p.153) lorsque l' [ $^{125}$ I]-angiogénine (1 nM) et le PRI (1 nM) sont incubés en même temps, la radioactivité associée aux cellules est diminuée de 65 % par rapport à celle obtenue lors de l'incubation de l' [ $^{125}$ I]-angiogénine seule.



**Figure 35** : Effet du PRI et du cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ) sur la fixation de l'angioténine sur les BBCE.

Le taux d'inhibition obtenu (65 %) est du même ordre de grandeur que celui obtenu lors de l'inhibition de l'activité mitogène de l'angiogénine par le PRI (60 %).

Les travaux de Badet et al. (1989) ont abouti à une inhibition également du même ordre puisqu'en présence de PRI, la fixation de l'angiogénine sur les cellules endothéliales d'artère pulmonaire de Boeuf est diminuée à 77 %. Par contre, Hu et al. (1991) ont montré que, même en présence de PRI, l'angiogénine se fixe préférentiellement sur son récepteur.

### 3 - Effet du cuivre sur la fixation de l'angiogénine

Badet et al. (1989) ont montré que le cuivre (100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{++}$ ) permettait d'augmenter considérablement la fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules endothéliales d'artère. De même, ces auteurs ont montré que la combinaison cuivre et PRI entraînait la diminution de la fixation de l'angiogénine due à l'effet inhibiteur du PRI.

Dans nos expériences de fixation de l'angiogénine, nous avons tout d'abord, doser la fixation spécifique de l' $^{125}\text{I}$ -angiogénine (1 nM) en présence de cuivre (100  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{++}$ ), puis en présence de la combinaison cuivre et PRI (1 nM).

La fixation spécifique de l' $^{125}\text{I}$ -angiogénine sur les cellules BBCE, ainsi obtenue est représentée dans la Fig.35 (p.153). Les résultats montrent d'une part, que la fixation de l'angiogénine en présence de cuivre est augmentée de 25 %, et d'autre part, que la présence du cuivre empêche l'action du PRI.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'induire une fixation de l'angiogénine sur les cellules BAAE par l'intermédiaire du cuivre. Les résultats ont montré que même en présence de cuivre, l'angiogénine bovine ne se fixe pas sur les cellules d'aorte de Boeuf.

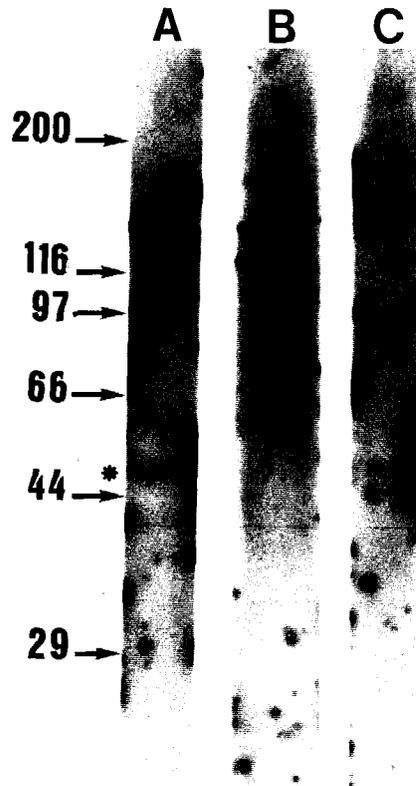
### **C - VISUALISATION DU RECEPTEUR DE L'ANGIOGENINE**

Après avoir défini les paramètres de fixation de l'angiogénine sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf, nous nous sommes intéressés à la visualisation du récepteur lui même. L'étude a été réalisée en parallèle sur les cellules BBCE et BAAE.

Pour cette étude, les protéines membranaires solubilisées, obtenues après lyse des cellules, sont séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) (technique décrite p.97-98). Après SDS-PAGE, la renaturation du récepteur n'est pas toujours possible. Pour prévenir celà, nous avons diminué à 1 % le taux de SDS présent dans le tampon échantillon des protéines.

Après séparation, les protéines membranaires sont transférées sur membrane de nitrocellulose. Le récepteur est ensuite révélé par reconnaissance directe par l' [<sup>125</sup>I]-angiogénine.

L'autoradiogramme ainsi obtenu (Fig. 36, p.156), montre que seule une bande correspondante à la masse moléculaire apparente de 49 kDa est révélée (piste A), lors de l'analyse des protéines membranaires issues des cellules BBCE. Cette bande n'est plus visible, si avant autoradiographie, l' [<sup>125</sup>I]-angiogénine a été mise en compétition avec 100 excès molaire d'angiogénine non marquée (piste B). La fixation de l' [<sup>125</sup>I]-angiogénine est déplacée par un excès d'angiogénine non marquée, la bande de 49 kDa mise en évidence parmi les protéines



**Figure 36** : Autoradiogramme des protéines membranaires solubilisées, des BBCE (pistes A et B) et des BAAE (piste C). Après transfert, la nitrocellulose est incubée 2 h avec 30 ng/ml de [ $^{125}$ I]-angiogénine sans angiogénine non marquée (pistes A et C), ou avec 100 excès molaire d'angiogénine non marquée (piste B), puis autoradiographiée 3 jours à  $-70^{\circ}\text{C}$ .

membranaires des cellules BBCE correspondrait donc bien au récepteur de l'angiogénine bovine.

Par contre, aucune bande n'est révélée parmi les protéines membranaires des cellules BAAE (piste C). Ces résultats confirment ceux obtenus par les techniques de dosage radiorécepteur, il n'existe pas de récepteur de l'angiogénine bovine sur les cellules BAAE.

#### D - CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats montrent l'existence d'un récepteur de 49 kDa, spécifique de l'angiogénine bovine sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf. L'analyse selon la représentation de Scatchard de la fixation de l'angiogénine sur les BBCE, nous a permis de déterminer que le récepteur de l'angiogénine est un récepteur de haute affinité ( $5 \times 10^{-10}$  M) et de faible capacité (11.000 sites/cellule). Nous avons également montré que le PRI, inhibiteur de toutes les activités biologiques de l'angiogénine, inhibe aussi la fixation de l'angiogénine sur les récepteurs spécifiques à la surface des cellules BBCE.

Par ailleurs, nous avons montré que le récepteur de l'angiogénine n'est présent qu'à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Boeuf. En effet, aucune fixation de l'angiogénine n'a été mise en évidence à la surface de cellules endothéliales de gros vaisseaux telles que les cellules endothéliales d'aorte de Boeuf. De même, ce récepteur n'existe pas sur d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes.

Badet et al. (1989) et de Hu et al. (1991) ont décrit une fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules endothéliales. Si nous comparons leurs résultats aux résultats que nous avons obtenus

(Tableau VI, p.158), nous observons que nos résultats sont très différents des leurs. En effet, ces auteurs ont mis en évidence la fixation de l'angiogénine sur divers types de cellules endothéliales.

# CONCLUSION

## CONCLUSIONS GENERALES

Au cours de la première période de nos recherches, nous avons mis au point une nouvelle méthode de préparation de l'angiogénine du lait de Vache qui nous permette d'obtenir de l'angiogénine dans un état de pureté absolue et avec des rendements très élevés. Nous avons pu ainsi montrer que le lait de Vache renfermait 1,5 à 4,5 mg d'angiogénine par litre, soit 5 à 10 fois plus que n'en apportait le premier protocole décrit en 1989 par Daniel Damart. Le lait représente donc un milieu biologique mieux adapté à l'isolement de l'angiogénine bovine par rapport au plasma qui n'en renferme que 80 $\mu$ g par litre. Nous avons donc rempli la première mission qui nous avait été confiée: améliorer la méthode d'isolement de l'angiogénine du lait de Vache.

L'application de cette méthode nous a permis de préparer suffisamment de substance pure pour obtenir les premiers cristaux dans le Laboratoire du Professeur Acharaya (Université de Bath). L'étude de ces cristaux par diffraction des rayons X conduira à la définition de la conformation 3D de la protéine. Parallèlement, une étude par résonance magnétique nucléaire est actuellement réalisée par le Laboratoire du Professeur Y. Lallemand à l'Ecole Polytechnique de Palaiseau.

L'ensemble de ces recherches sur la structure 3D de l'angiogénine bovine permettront de définir les relations structure-fonction de cette intéressante protéine car la question subsiste de connaître et son origine et son rôle. Peut-être est-elle utile au veau et il faudrait alors vérifier que l'angiogénine passe bien la barrière intestinale. Peut-être provient-elle tout simplement de l'hypervascularisation de la glande mammaire de la Vache et peut-être est-elle liée à la production même du

lait? On pourrait alors imaginer un test de sélection de "bonnes laitières" sur la base du dosage de l'angiogénine du lait.

Au cours de nos recherches, nous avons caractérisé deux autres protéines que nous avons purifiées.

La première est une ribonucléase présente à la concentration de 1 à 3 mg/l de lait. Cette nouvelle protéine de la famille des ribonucléases possède une masse moléculaire apparente de 16 000 Da. Sa fonction N-terminale étant "bloquée" par un résidu d'acide pyroglutamique, nous nous sommes tournée vers la détermination de séquences peptidiques "internes", en collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Biomolécules de l'Institut Pasteur de Lille du Professeur André Tartar. Nous avons pu ainsi montrer que ces séquences étaient absolument identiques aux séquences connues de la ribonucléase BL4 du foie de Boeuf (Hofsteenge et al., 1989). En outre, l'alignement des séquences peptidiques de cette nouvelle RNase avec celle de l'angiogénine et de la RNase pancréatique bovines, montre que ces trois protéines présentent environ 40 % d'homologies structurales et que les acides aminés du site actif de la RNase pancréatique bovine sont conservés. Sa spécificité d'action sur les ARN reste à définir. Enfin, nous avons montré que cette RNase isolée du lait de Vache ne possédait pas d'activité angiogénique. La question se pose donc de son rôle biologique et de l'importance de sa présence dans le lait de Vache.

La seconde protéine semble être une deuxième angiogénine ou une "angiogénine-like". En effet, les premiers résultats que nous avons obtenus montrent que la séquence N-terminale est identique à celle de l'angiogénine ainsi que sa masse moléculaire apparente (15 kDa en gel de polyacrylamide). Une analyse immunochimique par Western-blot, réalisée à l'aide d'un antisérum anti-angiogénine monospécifique, a

montré l'existence d'épitopes communs avec l'angiogénine, alors que ni la RNase pancréatique, ni la RNase du lait de Vache ne sont reconnues par cet antisérum. Néanmoins, cette protéine et l'angiogénine sont éluées différemment en chromatographie FPLC sur colonne de Mono-S. L'ensemble de ces résultats laissent donc penser qu'il s'agit d'un variant de l'angiogénine bovine et nous l'avons nommée "Bis-angiogénine" en attendant les analyses complémentaires qui conduiront à la détermination de sa nature exacte. Si l'existence de ce variant de l'angiogénine était confirmée, il serait alors très intéressant d'étudier ses propriétés biologiques et de les comparer à celles de l'angiogénine elle-même.

Dans une seconde étape, nos recherches ont porté sur le rôle biologique de l'angiogénine du lait de Vache en appliquant le test de la vascularisation de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de Poulet, test que nous avons perfectionné en le rendant quantitatif.

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les angiogénines humaine et bovine possèdent la même activité angiogénique in vivo. Par contre, si nous comparons les angiogénines isolées de milieux biologiques aux angiogénines recombinantes, les potentiels angiogéniques sont différents.

La troisième étape de nos travaux a apporté la démonstration que l'angiogénine bovine possédait une activité mitogène vis-à-vis de capillaires, découverte originale puisque, jusqu'à présent, l'angiogénine était toujours décrite comme un facteur non-mitogène vis-à-vis de ces cellules. Ses effets angiogéniques in vivo étaient alors expliqués par les

auteurs par une action sur la différenciation des cellules endothéliales ou par l'intervention d'autres cellules susceptibles de produire des facteurs angiogéniques et/ou mitogènes. Nos recherches nous ont amenée à décrire, pour la première fois, une activité mitogène de l'angiogénine du lait de Vache et nous avons montré que cette activité était très spécifique des cellules endothéliales des **capillaires cérébraux** de la Vache. En effet, 100 ng d'angiogénine par ml de milieu de culture induisent la prolifération de ces cellules, alors que la même concentration reste sans activité sur les cellules endothéliales **aortiques**. Nous avons également vérifié que cette activité n'existait pas vis-à-vis d'autres types cellulaires, notamment vis-à-vis des fibroblastes.

A la question qui se pose de savoir pourquoi nous avons été les premiers à montrer que l'angiogénine possédait une activité mitogène, nous pouvons apporter un premier élément de réponse en nous fondant sur la technique de préparation des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. En effet, dans la technique la plus couramment utilisée, les cellules endothéliales sont isolées par digestion enzymatique à partir de la substance grise, si bien que les préparations sont en fait constituées d'un mélange de cellules issues de microvaisseaux où les cellules endothéliales de capillaires sont minoritaires par rapport aux cellules d'artérioles et de veinules. Or, dans la technique de préparation des cellules endothéliales de capillaires cérébraux que nous avons utilisée et qui est celle de Méresse et collaborateurs décrite en 1989, la substance grise est homogénéisée mécaniquement, puis filtrée. Les microvaisseaux ainsi récoltés sont presque exclusivement constitués de capillaires qui sont ensuite ensemencés sur une matrice extracellulaire dans laquelle une cellule va émerger du capillaire pour donner naissance à un clone de cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Les cellules issues de ce clone sont ensuite récupérées par microtrypsination. Les cultures

obtenues de cette manière sont uniquement d'origine capillaire, car seuls les clones émergeant de capillaires sont récupérés.

Le fait d'avoir travaillé sur des cultures pures explique vraisemblablement l'observation originale que nous avons faite de l'activité mitogène de l'angiogénine.

La suite logique de cette découverte était la recherche des récepteurs membranaires de l'angiogénine. La différence d'activité de l'angiogénine vis-à-vis des cellules endothéliales d'aorte et de capillaires cérébraux pouvait en effet, s'expliquer par la présence de récepteurs de l'angiogénine uniquement à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Les recherches que nous avons alors entreprises nous ont conduite à la démonstration de l'existence de tels récepteurs spécifiques et de démontrer que ces récepteurs de 49 kDa et de haute affinité ( $5 \times 10^{-10}$  M, 11 000 sites/cellule) étaient présents à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de Vache et absents des cellules endothéliales aortiques.

L'étude cinétique de la fixation de l'angiogénine en fonction de la durée des cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux, nous a permis de montrer que plus la densité cellulaire augmentait, plus le nombre de sites de fixation de l'angiogénine diminuait. Ainsi donc, aussi bien pour l'angiogénine que pour d'autres facteurs de croissance comme le FGF (Neufeld et Gospodarowicz, 1985) et le TGF  $\beta$  (Rizzino et al., 1988), la régulation de l'expression des récepteurs spécifiques à la surface des cellules dépend de la densité cellulaire.

La découverte de l'angiogénine est encore trop récente pour que tous les mécanismes de son action soient élucidés. Il reste notamment à

déterminer les réactions que sa fixation sur les récepteurs entraîne à l'intérieur de la cellule endothéliale et aussi à répondre aux questions suivantes:

- L'angiogénine est-elle présente dans le lait de Femme ?
- L'angiogénine est-elle un facteur chimiotactique?
- L'angiogénine agit-elle sur la production de protéases comme l'activateur du plasminogène ou la collagénase?
- Les récepteurs de l'angiogénine sont-ils présents dans les membranes des cellules endothéliales de tous les capillaires?
- L'angiogénine agit-elle seule ou associée à d'autres facteurs angiogéniques et/ou mitogènes?

Autant de questions nouvelles que soulèvent nos propres travaux et qui montrent que, en recherche scientifique, la solution d'un problème en soulève aussitôt beaucoup d'autres.

# BIBLIOGRAPHIE

ANZANO M.A., ROBERTS A.B. et SPORN A.B. (1986) Anchorage independent growth of primary Rat embryo cells is induced by platelet-derived growth factor and inhibited by type-beta transforming growth factor. J. Cell Physiol. 126:312-318.

ASSOIAN R.K., KOMORIYA A., MEYERS C.A., MILLER D.M. et SPORN M.B. (1983) Transforming growth factor-beta in human platelets. J. Biol. Chem. 258:7155-7160.

AUERBACH R., KUBAI L., KNIGHTON D. et FOLKMAN J. (1974) A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos. Dev. Biol. 41:391-394.

AUERBACH R. (1981) Angiogenesis-inducing factors: a review. In: Pick E. (ed) "Lymphokines". Academic Press London, pp 69-88.

AUSPRUNK D.H. et FOLKMAN J. (1977) Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc. Res. 14:53-65.

AUSPRUNK D.H., KNIGHTON D.R. et FOLKMAN J. (1974) Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. Dev. Biol. 38:237-248.

AZIZKHAN J.C., SULLIVAN R., AZIZKHAN R., ZETTER B. et KLAGSBRUN M. (1983) The stimulation of capillary endothelial cell migration by chondrosarcoma-derived growth factor. Cancer Res. 43:3281-3286.

**BADET J., SONCIN F., GUITTON J.D., LAMARE O., CARTWRIGHT T. et BARRITAU D. (1989)** Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8427-8431.

**BAR T. (1980)** The vascular system of the cerebral cortex. Adv. Anat. Embryo. Cell Biol. 59:1-62.

**BARKER R.L., LOEGERING D.A., TEN R.H., HAMANN K.J., PEASE L.R. et GLEICH G.J. (1989)** Eosinophil cationic protein cDNA: comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. J. Immunol. 143:952-955.

**BASHKIN P., DOCTROW S., KLAGSBRUN M., SVAHN C.M., FOLKMAN J. et VLODAVSKY I. (1989)** Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparanase and heparin-like molecules. Biochemistry 28:1737-1743.

**BEINTEMA J.J. (1987)** Life Chem. Rep. 4:333-389.

**BEINTEMA J.J., WIETZES P., WEICKMANN J.L. et GLITZ D.J. (1984)** Anal. Biochem. 136:48-64.

**BEUTLER B., MAHONEY J., LE TRANG N., PEKAPA P. et CERAMI A. (1985)** Purification of cachectin, a lipoprotein lipase suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. J. Exp. Med. 161:984-995.

BICKNELL R.B. et VALLEE B.L. (1988) Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5961-5965.

BICKNELL R. et VALLEE B.L. (1989) Angiogenin stimulates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A<sub>2</sub>. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1573-1577.

BIRDWELL C.R., GOSPODAROWICZ D. et NICOLSON G.L. (1977) Factors from 3T3 cells stimulate proliferation of cultured vascular endothelial cells. Nature 268:528-531.

BLACKBURN P., WILSON G. et MOORE S. (1977) Ribonuclease inhibitor from human placenta: purification and properties. J. Biol. Chem. 252:5904-5910.

BLACKBURN P. et MOORE S. (1982) Pancreatic Ribonuclease. Enzymes 3rd ed, 15:317-433.

BOHLEN P., BAIRD A., ESCH F., LING N. et GOSPODAROWICZ D. (1984) Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5364-5368.

BOND M.D. (1988) An in vitro binding assay for angiogenin using placenta ribonuclease inhibitor. Anal. Biochem. 173:166-173.

BOND M.D. et VALLEE B.L. (1988) Isolation of bovine angiogenin using a placental ribonuclease inhibitor binding assay. Biochemistry 27:6282-6287.

BOND M.D. et STRYDOM D.J. (1989) Amino acid sequence of bovine angiogenin. Biochemistry 28:6110-6113.

BOND M.D. et VALLEE B.L. (1990a) Isolation and sequencing of mouse angiogenin DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 171:988-995.

BOND M.D. et VALLEE B.L. (1990b) Replacement of residues 8-22 of angiogenin with 7-21 of RNase A selectively affects protein synthesis inhibition and angiogenesis. Biochemistry 29:3341-3349.

BOOYSE F.M., BELL S. et SEDLAK B. (1975) Development of an in vitro vessel wall model for studying certain aspects of platelet-vessel (endothelial) interactions. Artery 1:518-539.

BREM S. et FOLKMAN J. (1975) Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage. J. Exp. Med. 141:427-438.

BURGER P.C., CHANDLER D.B. et KLINTWORTH G.K. (1983) Corneal neovascularization as studied by scanning electron microscopy of vascular casts. Lab. Invest. 48:169-180.

CARPENTER G. (1987) Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Annu. Rev. Biochem. 56:881-894.

CARSWELL E.A., OLD L.J., KASSEL R.L., GREEN S., FIORE N. et WILLIAMSON B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes tumor necrosis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3666-3670.

CHEIFETZ S., ANDRES J.L. et MASSAGUE J. (1988a) The transforming growth factor- $\beta$  receptor type III is a membrane proteoglycan. J. Biol. Chem. 263:16984-16991.

CHEIFETZ S., BASSOLS A., STANLEY K., OHTA M., GREENBERGER J. et MASSAGUE J. (1988b) Heterodimeric transforming growth factor- $\beta$ . Biological properties and interaction with three types of cell surface receptors. J. Biol. Chem. 263:10783-10789.

CHERESH D.A. (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6471-6475.

CLARK E.R. et CLARK E.L. (1939) Microscopic observations on the growth of blood capillary in the living mammals. Am. J. Anat. 64:251-301.

CZECH M.P., CLAIMORT K.B., YAGALOFF K.A. et CORVERA S. (1990) Properties and regulation of receptors for growth factors. In: Sporn M.B. et Roberts A.B. (eds) "Peptide Growth Factors and Their Receptor I". Springer Verlag, pp 37-65.

CONNOLLY D.T., HEUVELMAN D.M., NELSON R., OLANDER J.V., EPPLEY B.L., DELFINO J.J., SIEGEL N.R., LEIMGRUNDER R.M. et FEDER J. (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J. Clin. Invest. 84:1470-1478.

CRUM R., SZADO S. et FOLKMAN J. (1985) A new class of steroids inhibits angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment. Science 230:1375-1378.

D'ALESSIO J.J., DI DONATO A., PARENTE A. et PICCOLI R. (1987) Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. TIBS 16:104-106.

DAMART D. (1989) Isolement et étude de l'angiogénine du lait de Vache. Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres-Artois. N° d'ordre 335.

D'AMORE P.A. et THOMPSON R.W. (1987) Mechanisms of angiogenesis. Ann. Rev. Physiol. 49:453-464.

D'AMORE P.A. et KLAGSBRUN M. (1989) Angiogenesis - factors and mechanisms. In: Sirica A.E. (ed) "Pathology of neoplasia". Plenum, New York, pp 513-531.

DAVIDSON J.M., KLAGSBRUN M., HILL K.E., BUCKLEY A., SULLIVAN R., BREWER S. et WOODWARD S.C. (1985) Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived factor. J. Biol. Chem. 100:1219-1227.

DENEFLE P., KOVARIK S., GUITTON J.D., CARTWRIGHT T. et MAYAUX J.F. (1987) Chemical synthesis of a gene coding for human angiogenin, its expression in Escherichia coli and conversion of the product into its active form. Gene 56:61-70.

DENEKAMP J. (1984) Vasculature as a target for tumor therapy; In: Hammersen F. et Hudlicka O. (eds) "Progress in applied microcirculation". Karger, Basel, pp 28-38.

DERYNCK R., ROBERTS A.B., WINKLER M.E., CHEN E.Y. et GOEDDEL D.V. (1984) Human transforming growth factor- $\alpha$ : precursor structure and expression in E. coli. Cell 38:287-297.

DERYNCK R. (1990) Transforming growth factor- $\alpha$ . Mol. Reprod. Develop. 27:3-9.

DUGAN J.D.Jr, ROBERTS A.B., SPORN M.B. et GLASER B.M. (1988) Transforming growth factor beta (TGF  $\beta$ ) inhibits neovascularization in vivo. J. Cell Biol. 107:579a.

DURAKIT D.T., SUMI S.M., KLEBANOFF S.J. (1979) Neurotoxicity of human eosinophils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1443-1447.

DUSTING G.J., MONCADS S. et VANE J.R. (1982) In: Oates J.A. (ed) "Prostaglandins and the cardiovascular system". Raven, New-York, pp 59-106.

ESCH F., UENO N., BAIRD A., HILL F., DENOROY L., LING N., GOSPODAROWICZ D. et GUILLEMIN R. (1985) Primary structure of bovine brain acidic fibroblast growth factor (aFGF). Biochem. Biophys. Res. Commun. 133:554-562.

FAJARDO M.D. (1989) Special report. The complexity of endothelial cells. Amer. J. Clin. Pathol. 92:241-250.

**FEIGE J.J. et BAIRD A. (1988)** Glycosylation of acidic fibroblast growth factor receptor - The contribution of carbohydrate to receptor function. J. Biol. Chem. 263:14023-14029.

**FETT J.W., STRYDOM D.J., LOBB R.R., ALDERMAN E.M., BETHUNE J.L., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1985)** Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry 24:5480-5486.

**FETT J.W., BETHUNE J.L. et VALLEE B.L. (1987)** Induction of angiogenesis by mixtures of two angiogenic proteins, angiogenin and acidic fibroblast growth factor, in the chick chorioallantoic membrane. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:1122-1131.

**FERRARA N. et HENZEL W.J. (1989)** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851.

**FOLKMAN J. (1971)** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. 285:1182-1186.

**FOLKMAN J., MERLER E., ABERNATHY C. et WILLIAMS C. (1971)** Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med. 113:275-288.

**FOLKMAN J. (1972)** Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. Ann. Surg. 175:409-416.

FOLKMAN J. (1974) Tumor angiogenesis factor. Cancer Res. 34:2109-2113.

FOLKMAN J., KNIGHTON D. et KLAGSBRUN M. (1976) Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture. Cancer Res., 36:110-114.

FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C. et ZETTER B.R. (1979) Long-term culture of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5217-5221.

FOLKMAN J. et HAUDENSCHILD C. (1980) Angiogenesis in vitro. Nature 288:551-556.

FOLKMAN J. (1982) Angiogenesis: initiation and control. J. Cell Biol. 104:212-227.

FOLKMAN J., LANGER R., LINHARDT R., HAUDENSCHILD C. et TAYLOR S. (1983) Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. Science 221:719-725.

FOLKMAN J. (1985a) Tumor angiogenesis. In: Klein G. et Weinhouse S. (eds) "Advances in Cancer Research." Academic Press New York, pp 175-203.

FOLKMAN J. (1985b) Angiogenesis and its inhibitors. In: DeVita V.T., Hellman S. et Rosenberg S.A. (eds) "Important advances in oncology". Lippincott, Philadelphia, pp 42-62.

FOLKMAN J. et KLAGSBRUN M. (1987a) A family of angiogenic peptides. Nature 329:671-672.

FOLKMAN J. et KLAGSBRUN M. (1987b) Angiogenic factors. Science 235:442-447.

FOLKMAN J., KLAGSBRUN M., SASSE J., WADZINSKI M., INGBER D. et VLODAVSKY I. (1988) Heparin-binding angiogenic protein - basic fibroblast growth factor - is stored within basement membrane. Am. J. Pathol. 130:393-400.

FOLKMAN J., WEISZ P., JOULLIE M., LI W. et EWING W. (1989) Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes. Science 243:1490-1493.

FORM D.M. et AUERBACH R. (1983) PGE<sub>2</sub> and angiogenesis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172:214-218.

FRATER-SCHRODER M., MULLER G., BIRCHMEIER W. et BOHLEN P. (1986) Transforming growth factor-beta inhibits endothelial cell proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 137:295-302.

FRATER-SCHRODER M., RISAU W., HALLMANN R., GAUTSCHI P. et BOHLEN P. (1987) Tumor necrosis factor type  $\alpha$ , a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5227-5281.

FRIESEL R., BURGESS W.H., MEHLMAN T. et MACIAG T. (1986) The characterization of the receptor for endothelial cell growth factor by covalent ligand attachment. J. Biol. Chem. 261:7581-7584.

FROLIK C.A., DART L.L., MEYERS C.A., SMITH D.M. et SPORN M.B. (1983) Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:3676-3680.

FROLIK C.A., WAKEFIELD L.M., SMITH D.M. et SPORN M.B. (1984) Characterization of a membrane receptor for transforming growth factor- $\beta$  in normal rat kidney fibroblasts. J. Biol. Chem., 259:10995-11000.

GILL G.N., BERTICS P.J. et STANTON J.B. (1987) Epidermal growth factor and its receptor. Mol. Cell Endocrinol. 51:169-186.

GIMBRONE M.A.Jr, COTRAN R.S. et FOLKMAN J. (1973) Endothelial regeneration and turnover - Studies with human endothelial cell cultures. Ser. Haematol. 6:453-455.

GIMBRONE M.A., COTRAN R.S., LEAPMAN S.B. et FOLKMAN J., (1974) Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. J. Natl. Cancer Inst. 52:413-427.

GIMENEZ-GALLEGO G., CONN G., HATCHER V.B. et THOMAS K.A. (1986) Human brain-derived acidic and basic fibroblast growth factors: amino terminal sequences and specific mitogenic activities. Biochem. Biophys. Res. Commun. 135:541-548.

GLASER B.M., D'AMORE P.A., SEPPA H., SEPPA S. et SCHIFFMANN E. (1980) Adult tissues contain chemoattractants for vascular endothelial cells. Nature 288:483-484.

GOSPODAROWICZ D. (1974) Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone in 3T3 cell growth. Nature 249:123-129.

GOSPODAROWICZ D. (1975) Purification of a fibroblast growth factor from bovine pituitary. J. Biol. Chem. 250:2515-2520.

GOSPODAROWICZ J., MORAN J., BRAUN D. et BIRDWELL C.R. (1976) Clonal growth of bovine endothelial cells in culture: fibroblast growth factor as a survival factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:4120-4124.

GOSPODAROWICZ D. et THAKRAL K. (1978) Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:847-851.

GRAY P.W., AGGARWAL B.B., BENTEB C.V., BRINGMAN T.S., HENZEL W.J., JARRETT J.A., LEUNG D.W., MOFFAT B., SVERDESKY L.P., PALLADINO M.A. et NEDWIN G.E. (1984) Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumor necrosis activity. Nature 320:584-588.

GREENBLATT M. et SHUBIK P. (1968) Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J. Natl. Cancer Inst. 41:111-124.

GROSS J.L., MOSCATELLI D. et RIFKIN D.B. (1983) Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2623-2627.

HALLAHAN T.W., SHAPIRO R. et VALLEE B.L. (1991) Dual site model for the organogenic activity of angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:2222-2226.

HARANAKA K.E., CARSWELL A., WILLIAMSON B.D., PRENDERGAST J.S., SATOMI N. et OLD L.J. (1986) Purification, characterization and antitumor activity of nonrecombinant mouse tumor necrosis factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:3949-3953.

HARPER J.W. et VALLEE B.L. (1988a) Conformational characterization of human angiogenin by limited proteolysis. J. Prot. Chem. 7:355-363.

HARPER J.W. et VALLEE B.L. (1988b) Mutagenesis of aspartic acid-116 enhances the ribonucleolytic activity and angiogenic potency of angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7139-7143.

HARPER J.W. et VALLEE B.L. (1989) A covalent angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis. Biochemistry 28:1875-1884.

HARPER J.M., FOX E.A., SHAPIRO R. et VALLEE B.L. (1990) Mutagenesis of the residues flanking Lys-40 enhances the enzymatic activity and reduces the angiogenic potency of angiogenin. Biochemistry 29:7297-7302.

HAUDENSCHILD C.C., ZAHNISER D., FOLKMAN J. et KLAGSBRUN M. (1976) Human endothelial cells in culture - Lack of response to serum growth factors. Exp. Cell Res. 98:175-183.

HEATH W.F., MOORE F., BICKNELL R. et VALLEE B.L. (1989) Modulation of mitogenic stimuli by angiogenin correlates with in vitro phosphatidylinositol biphosphate synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2718-2722.

HEIMARK R.L., TWARDZIK D.R. et SCHWARTZ S.M. (1986), Inhibition of endothelial regeneration by type-beta transforming growth factor from platelets. Science 233:1078-1080.

HOBBS J.F. et CLIFF W.J. (1971) Observations on tissue grafts established in rabbit ear chambers - A combined light and electron microscopy study. J. Exp. Med. 134:963-971.

HOCKEL M., SASSE J. et WISSLER J. (1987) Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes, and "tube formation" but not proliferation of capillary endothelial cells in vitro. J. Cell Physiol. 133:1-3.

HOCKEL M., JUNG W., VAUPEL P., RABES H., KLADELPOUR C. et WISSLER J.H. (1988) Purified monocyte-derived angiogenic substance (angiotropin) induces controled angiogenesis associated with regulated tissue proliferation in rabbit skin. J. Clin. Invest. 82:1075-1090.

HOFSTEENGE J., MATTHIES R. et STONE S.R. (1989) Primary structure of a ribonuclease from porcine liver, a new member of the ribonuclease superfamily. Biochemistry 28:9806-9813.

HU G.F., CHANG S.I., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1991) An angiogenin-binding protein from endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2227-2231.

HUANG S.S. et HUANG J.S. (1986), Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. J. Biol. Chem. 261:9568-9571.

IBERG N., ROGELT S., FANNING P. et KLAGSBRUN M. (1989) Purification of 18 and 22 kDa forms of basic fibroblast growth factor from rat cells transformed by the ras oncogene. J. Biol. Chem. 264:19951-19955.

IGNOTZ R. et MASSAGUE J. (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. J. Biol. Chem. 261:4337-4345.

IMAMURA T., TOKITA Y. et MITSUI Y. (1988) Purification of basic FGF receptor from rat brain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:583-590.

INGBER D.E., MADRI J.A. et FOLKMAN J. (1986) A possible mechanism for inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids: induction of capillary basement membrane dissolution. Endocrinologie 119:1768-1775.

**INGBER D.E., MADRI J.A. et FOLKMAN J. (1987)** Endothelial growth factors and extracellular matrix regulate DNA synthesis through modulation of cell and nuclear expansion. In Vitro Cell Dev. Biol. 23:387-394.

**ISHIKAWA F., MIYAZONO K., HELLMAN V., WERNSTEDT C., HAGIWARA K., USUKI K., TAKAKU F. et HELDIN C.H. (1989)**, Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. Nature 338:557-562.

**ISHIWATA I., ISHIWATA C., SOMA M., NAIK D.R., HASHIMOTO H., SUDO T. et ISHIKAWA H. (1990)** Effect of tumour angiogenesis factor on proliferation of endothelial cell and tube formation. Virchows Archiv. A Pathol. Anat. 417:473-476.

**JACOB W., JENTZSCH K.D., MAUERSBERGER B. et OEHME P. (1977)** Demonstration of angiogenesis activity in the corpus luteum of cattle. Exp. Pathol. 13:231-236.

**JAFFE E.A., NACHMAN R.L., BECKER C.G. et MINICK C.R. (1973)** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest. 52:2745-2756.

**JENNINGS J.C., MOHAN S., LINKHART T.A., WIDSTROM R. et BAYLINK D.J. (1988)** Comparison of the biological activities of TGF- $\beta_1$  and TGF- $\beta_2$ : differential activity in endothelial cells. J. Cell Physiol. 137:167-172.

JOO F. (1985) Blood brain barrier in vitro, ten years of recherche on microvessels isolated from the brain. Neurochem. Int. 7:1-25.

KALEBIC T., GARBISA S., GLASER B. et LIOTTA L.A. (1983) Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science 221:281-283.

KAMERLING J.P., GERWIG G.J., VLIEGENTHART J.F.G. et CLAMP J.R. (1975) Characterization by gas liquid chromatography mass spectrometry of pertrimethylsilyl glycosides obtained in the methanolysis of glycoproteins and glycolipids. Biochem. J. 151:491-495.

KARNOVSKY M.J. (1967) The ultrastructural basis of capillary permeability studied with horseradish peroxidase. J. Cell Biol. 35:213-236.

KEEGAN A., HILL C., KUMAR S., PHILIPPS P., SHOR A. et WEISS J. (1982) Purified tumor angiogenesis factor enhances proliferation of capillary, but not aortic, endothelial cells in vitro. J. Cell Sci. 55:261-276.

KESKI-OJA J., LYONS R.M. et MOSES M.L. (1987) Inactive secreted form(s) of transforming growth factor-beta: activation by proteolysis. J. Cell Biochem. [suppl.] 11a:60.

KIMURA T.B., CHINO N., KUMAGAYE S.I., KURODA H., EMURA J. et SAKARIBARA S. (1990) Strategy for the chemical synthesis of large peptide; synthesis of angiogenin as an example. Biochem. Soc. Trans. 18:1297-1299.

- KLAGSBRUN M., KNIGHTON D. et FOLKMAN J. (1976)** Tumor angiogenesis in cell grown in tissue culture. Cancer Res. 36:110-114.
- KREISLE R.A. et ERSHLER W.B. (1988)** Investigation of tumor angiogenesis in an Id mouse model: role of host-tumor interactions. J. Natl. Cancer Inst. 80:849-854.
- KULL F.C.Jr, BRENT D.A., PARIKH I. et CUATRECASAS P. (1987)** Chemical identification of a tumor-derived angiogenic factor. Science 236:843-845.
- KUMAR S., WEST D.C. et AGER A. (1987)** Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels; In: Differentiation, Springer-Verlag, 36:57-70.
- KURACHI K., DAVIE E.W., STRYDOM D.J., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1985)** Sequence of the cDNA and gene for angiogenin, a human angiogenesis factor. Biochemistry 24:5494-5799.
- KURACHI K., RYBAK S.M., FETT J.W., SHAPIRO R., STRYDOM D.J., OLSON K.A., RIORDAN J.F., DAVIE E.W. et VALLEE B.L. (1988)** Expression of human angiogenin in cultured baby hamster kidney cells. Biochemistry 27:6557-6552.
- LAEMMLI U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227:680-682.
- LANGER R. et FOLKMAN J. (1976)** Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. Nature 263:797-800.

LANGER R.S., CONN H., VACANTI J.P., HAUDENSCHILD C. et FOLKMAN J. (1980) Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4431-4435.

LAWRENCE D.A., PIRCHER R., KRYCEVE-MARTINERIE C. et JULIEN P. (1984) Normal embryo fibroblasts release transforming growth factors in a latent form. J. Cell Physiol. 121:184-188.

LAWRENCE D.A., PIRCHER R. et JULIEN P. (1985) Conversion of a high molecular weight latent beta-TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active beta-TGF under acidic conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 133:1026-1034.

LEE F.S. et VALLEE B.L. (1989a) Characterization of ribonucleolytic activity of angiogenin towards tRNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:121-126.

LEE F.S. et VALLEE B.L. (1989b) Binding of placental ribonuclease inhibitor to the active site of angiogenin. Biochemistry 28:3556-3561.

LEE F.S., SHAPIRO R. et VALLEE B.L. (1989a) Tight-binding inhibition of angiogenin and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor. Biochemistry 28:225-230.

LEE S.F., AULD D.S. et VALLEE B.L. (1989b) Tryptophan fluorescence as a probe of placental ribonuclease inhibitor binding to angiogenin. Biochemistry 28:219-224.

LEIBOVICH S.J., POLVERINI P.J., SHEPARD H.M., WISEMAN D.M., SHIVELY V. et NUSEIR N. (1987) Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor  $\alpha$ . Nature 239:630-632.

LEUNG D.W., CACHIANES G., KUANG W.J., GOEDDEL D.V. et FERRARA N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309.

LIN M.C., GUTTE B., CALDI D.G., MOORE S. et MERRIFIELD R.B. (1972) Reactivation of des(119-124) ribonuclease A by mixture with synthetic COOH-terminal peptides; the role of phenylalanine-120. J. Biol. Chem. 247:4768-4774.

LOWRY O.M., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.

MACIAG T., HOOVER G.A., VAN DER SPEK J., STEMERMAN M.B. et WEINSTEIN R. (1982) Growth and differentiation of human umbilical vein endothelial cells in culture. In: Book A., Sato G.H., Pardee A.B. et Subashu D.A. (eds) "Growth of cells in hormonally defined media". Cold Spring Harbor, pp 525-538.

MACIAG T., MEHLMAN T., FRIESEL R. et SCHREIBER A.B. (1984) Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal cell mitogen in bovine brain. Science 225:932-935.

MADTES D.K., RAINES E.W., SAKARIASSEN K.S., ASSOIAN R.K., SPORN M.B., BELL G.I. et ROSS R. (1988) Induction of transforming

growth factor- $\alpha$  in activated human alveolar macrophages. Cell 53:285-293.

MAES P., DAMART D., ROMMENS C., MONTREUIL J., SPIK G. et TARTAR A. (1988) The complete amino acid sequence of bovine milk angiogenin. FEBS Lett. 241:41-45.

MARQUARDT H., HUNKAPILLER M.W., HOOD L.E. et TODARO G.J. (1984) Rat transforming growth factor type I: structure and relationship to epidermal growth factor. Science 223:1079-1082.

MARSHALL R.D. (1972) Glycoproteins. Ann. Rev. Biochem. 41:673-702.

MASSAGUE J. (1985) Subunit structure of a high-affinity receptor for type- $\beta$  transforming growth factor. J. Biol. Chem. 260:7059-7066.

MASSAGUE J. et LIKE B. (1985) Cellular receptors for type beta transforming growth factor. J. Biol. Chem. 260:2636-2645.

MERESSE S., DEHOUCK M.P., DELORME P., BENSÂID M., TAUBER J.P., DELBART C., FRUCHART J.C. et CECHELLI R. (1989) Bovine brain capillary endothelial cells express tight-jonction and monoamine oxidase activity in long term culture. J. Neurochem. 53:1363-1371.

MIYAZONO K., OKABE T., URABE A., TAKAKU F. et HELDIN M. (1987) Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets. J. Biol. Chem. 262:4098-4103.

MOENNER M., CHEVALLIER B., BADET J. et BARRITAUD D. (1986) Evidence and characterization of the receptor to eye-derived growth factor I, the retinal form of basic fibroblast growth factor, on bovine epithelial lens cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5024-5028.

MONCADA S., GRYGLEWSKI R. et BUNKING S. (1976) An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature 263:663-665.

MONTESANO R., VASSALI J.D., BAIRD A., GUILLEMIN R. et ORCI L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7297-7301.

MOORE F. et RIORDAN J.F. (1990) Angiogenin activates phospholipase C and elicits a rapid incorporation of fatty acid into cholesterol esters in vascular smooth muscles cells. Biochemistry 29:228-233.

MOSCATELLI D., SILVERSTEIN J., MANEJAS R. et RIFKIN D.B., (1987a) Mr 25000 heparin binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5778-5782.

MOSCATELLI D., PRESTA M., JOSEPH-SILVERSTEIN J. et RIFKIN D.B. (1987b) Presence of basic fibroblast growth factor in a variety of cells and its binding to cells. In: Rifkin D.B. et Klagsbrun M. (eds) "Angiogenesis". Current communications in molecular biology. Cold Spring Harbor, New York, pp 47-51.

MOSES H.L., TUCKER R.F., LEOFFE.B., COFFEY R.J., HALPER J. et SHIPLEY G.D. (1985) Type beta transforming growth factor is a growth stimulator and a growth inhibitor. "Cancer Cells". Cold Spring Harbor, 3:65-71.

MUTHUKKARUPPAN V.R. et AUERBACH R. (1979) Angiogenesis in the mouse cornea. Science 205:1416-1417.

NEUFELD G. et GOSPODAROWICZ D. (1985) The identification and partial characterization of the fibroblast growth factor receptor of baby kidney cells. J. Biol. Chem. 260:13860-13868.

OLWIN B.B. et HAUSCHKA S.D. (1986) Identification of the fibroblast growth factor receptor of Swiss 3T3 cells and mouse skeletal muscle myoblasts. Biochemistry 25:3487-3492.

ORLIDGE A. et D'AMORE P. (1988) Endothelial cell-pericyte cocultures produce activated TGF- $\beta$  which inhibits endothelial cell growth. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 29:109.

PALADE G.E. (1960) Transport in quanta across the endothelium of blood capillaries. Anat. Rec. 136:254-264.

PALMER K.A., SCHERAGA H.A., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L., (1986) A preliminary three-dimensional structure of angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1965-1969.

PETERSON G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. Anal. Biochem. 83:346-356.

PLOUET J., OLIVIE M., COURTOIS Y. et BARRITAU D. (1984) A highly reliable and sensitive assay for the purification of cellular growth factors. J. Cell. Mol. Biol. 30:105-110.

PLOUET J., SCHILLING J. et GOSPODAROWICZ D. (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. EMBO J. 8:3801-3806.

PRESTA M., RUSNATTI M., MAIER J.A.M. et RAGNOTTI G. (1988) Purification of basic fibroblast growth factor from rat brain: identification of a Mr 22000 immunoreactive form. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155:1161-1988.

PROIA A.D., CHANDLER M.B., HAYNES W.L., SMITH C.S., SUVARNAMANI C., ERKEL F. et KLINTWORTH G.K. (1988) Quantitation of corneal neovascularization using computerized image analysis. Lab. Invest. 58:473-479.

RASTINEJAD F., POLVERINI P.J. et BOUCK N.P. (1989) Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. Cell 56:345-355.

RICHARDS F.M. et VITHAYATHIL P.J. (1959) The preparation of a subtilisin-modified ribonuclease and the separation of the peptide and protein components. J. Biol. Chem. 27:2705-2717.

RIFKIN D.B., GROSS J.L., MOSCATELLI D. et JAFFE E. (1982) Protease and angiogenesis: production of plasminogen activator and collagenase by endothelial cells; In: Nossel H.L. et Vogel H.J. (eds) "Pathobiology of the endothelial cells". Academic Press New York, pp 191-197.

RIZZINO A., KAZAKOFF P., RUFF E., KUSZYNSKI C. et NEBERSICK J. (1988) Regulatory effects of cell density on the binding of transforming growth factor  $\beta$ , platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor. Cancer Res. 48:4266-4271.

ROBERTS A.B., ANZANO M.A., LAMB L.C., SMITH J.M. et SPORN M.B. (1981) New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5339-5343.

ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S., WAKEFIELD L.M., HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J.H. et FAUCI A.S. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4167-4171.

ROSENBERG H.F., TENEN D.G. et ACKERMAN S.J. (1989) Molecular cloning of the human eosinophil-derived neurotoxin: a member of the ribonuclease gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4460-4464.

RUOSLAHTI E. et PIERSCHBACHER M.D. (1986) Arg-Gly-Asp: a versatile cell recognition signal. Cell 44:517-539.

RYAN T.J. et STOCKLEY A.T. (1980) Mechanical versus biochemical factors in angiogenesis. Microvasc. Res. 20:258-259.

RYAN T.J. et BARNHILL R.L. (1983) Physical factors and angiogenesis. Ciba Found Symp. 80-94.

RYBAK S.M., FETT J.W., YAO Q.Z. et VALLEE B.L. (1987) Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:1240-1248.

RYBAK S.M. et VALLEE B.L. (1988) Base cleavage specificity of angiogenin with Saccharomyces cerevisiae et E. coli 5S RNAs. Biochemistry 27:2288-2294.

RYBAK S.M., AULD D.S., ST CLAIR D.K., YAO Q.Z. et FETT J.W. (1989) C-terminal angiogenin peptides inhibit the biological and enzymatic activities of angiogenin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 162:535-543.

SCATCHARD G. (1949) The attraction of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672.

SCHLESSINGER J. (1988) The epidermal growth factor receptor as a multifunctional allosteric protein. Biochemistry 27:3119-3123.

SCHNEIDER R., SCHNEIDER-SCHERZER E., THURNHER M., AUER B. et SCHWEIGER M. (1988) The primary structure of human ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI) discloses a novel highly

diversified protein superfamily with a common repetitive module. EMBO J. 7:4151-4156.

**SCHREIBER A.B., WINKLER M.E. et DERYNCK R. (1986)** Transforming growth factor- $\alpha$ : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. Science 232:1250-1253.

**SEGARRINI P.R. et SEYEDIN S.M. (1988)** The high molecular weight receptor to transforming growth factor- $\beta$  contains glycosaminoglycan chains. J. Biol. Chem. 263:8366-8730.

**SEGARINI P.R., ROSEN D.M. et SEYEDIN S.M. (1989)** Binding of TGF- $\beta$  to cell surface proteins varies with cell type. Mol. Endocrinol. 3:261-272.

**SENGER D.R., CONNOLLY D., PERRUZZI C.A., ALSUP D., NELSON R., LEIMGRUBER R., FEDER J. et DVOVAK H. (1987)** Purification of a vascular permeability factor (VPF) from tumor cell conditioned medium. Fed. Proc. 42:2102.

**SEPPA H., GROTENDORST G., SEPPA S., SCHIFFMAN E. et MARTIN G.R. (1982)** Platelet-derived growth factor is chemotactic for fibroblasts. J. Cell Biol. 92:584-588.

**SEYEDIN S.M., THOMAS T.C., THOMPSON A.Y., ROSEN D.M. et PIEZ K.A. (1985)** Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2267-2271.

SHAPIRO R., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1986) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. Biochemistry 25:3527-3532.

SHAPIRO R., STRYDOM D.J., OLSON K.A. et VALLEE B.L. (1987a) Isolation of angiogenin from normal human plasma. Biochemistry 26:5141-5146.

SHAPIRO R., WEREMOWICZ S., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1987b) Ribonucleolytic activity of angiogenin: essential histidine, lysine et arginine residues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8783-8787.

SHAPIRO R. et VALLEE B.L. (1987) Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2238-2241.

SHAPIRO R., HARPER J.W., FOX E.A., JANSEN H.W., HEIN F. et UHLMANN E. (1988a) Expression of Met(-1) angiogenin in Escherichia coli: conversion to the authentic <Glu-1 protein. Anal. Biochem. 175:450-461.

SHAPIRO R., STRYDOM D.J., WEREMOWICZ S. et VALLEE B.L. (1988b) Site of modification of human angiogenin by bromoacetate at pH 5,5. Biochem. Biophys. Res. Commun. 156:530-536.

SHAPIRO R., FOX E.A. et RIORDAN J.F. (1989) Role of lysines in human angiogenin: chemical modification and site-derived mutagenesis. Biochemistry 28:1726-1732.

SHAPIRO R. et VALLEE B.L. (1989) Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin - Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. Biochemistry 28:7401-7408.

SHOR A.M., SHOR S.L., WEISS J.B., BROWN R.A., KUMAR S. et PHILIPPS P. (1980) Stimulation by a low-molecular weight angiogenic factor of capillary endothelial cells in culture. Br. J. Cancer 41:790-799.

SHOSHAN S. (1981) Wound healing. Intern. Rev. Conn. Tissue Res. 9:1-26.

SLIFMAN N.R., LOEGERING D.A., Mc KEAN D.J. et GLEICH G.J. (1986) Ribonuclease activity associated with human eosinophil-derived neurotoxin and eosinophil cationic protein. J. Immunol. 137:2913-2917.

SOMMER A., BREWER M.T., THOMPSON R.C., MOSCATELLI D., PRESTA M. et RIFKIN D.B. (1987) A form of human fibroblast growth factor with an extended amino terminus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42:543-550.

SPECTOR B.D., FILIPOVICH A.M., PERRY III G.S. et KERSEY J.H. (1982) Epidemiology of cancer in ataxia-telangiectasia. In: Bridges B.A., Harnden D.G. (eds) "Ataxia-telangiectasia: a cellular and molecular link between cancer neuropathology and immune deficiency." John Wiley and Sons, Chichester, England pp103-138.

SPIK G., TARTAR A. et MONTREUIL J. (1988) Brevet international PCT/FR 88/00566 du 18 novembre.

**SPLAWINSKI J., MICHNA M., PALCZAK R., KONTUREK S. et SPLAWINSKA B. (1988)** Angiogenesis: quantitative assessment by the chick chorioallantoic membrane assay. Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 10:221-226.

**SPORN M.B., ROBERTS A.B., WAKEFIELD L.M. et DE CROMBRUGGHE B. (1987)** Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J. Cell Biol. 105:1039-1045.

**SPORN M.B. et ROBERTS A.B. (1988)** Peptide growth factors are multifunctional. Nature 332:217-219.

**SPORN M.B. et ROBERTS A.B. (eds) (1990)** "Peptide growth factors and their receptors I and II". Springer-Verlag.

**STAROS J.V., FANGER B.O., FAULKER L.A., PALASWESKI P.P. et RUSSO M.W. (1989)** Mechanism of transmembrane signaling by the epidermal growth factor receptor/kinase. In: Moudgil V.K. (ed) "Receptor phosphorylation". CRC, Boca Raton FL, pp 227-242.

**St CLAIR D.K., RYBAK S.M., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1987)** Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8330-8334.

**ST CLAIR D.K., RYBAK S.M., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1988)** Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of 40S ribosomes. Biochemistry 27:7263-7268.

**STERN M. et DOSCHER M.S. (1984)** FEBS Lett. 171:253-256.

**STRYDOM D.J., FETT J.W., LOBB R.R., ALDERMAN E.M., BETHUNE J.F., RIORDAN J.F. et VALLEE B.L. (1985)** Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. Biochemistry 24:5486-5494.

**TAYLOR S. et FOLKMAN J. (1982)** Protamine is an inhibitor of angiogenesis. Nature 297:307-312.

**THOMAS K.A., RILEY M.C., LEMMON S.K., BAGLAN N.C. et BRADSHAW R.A. (1980)** Brain fibroblast growth factor. J. Biol. Chem. 255:5517-5520.

**THOMAS K.A., RIOS-CANDELORE M. et FITZPATRICK S. (1984)** Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:357-361.

**THOMAS K. et GIMENEZ-GALLEGO G. (1986)** Fibroblast growth factors: broad spectrum mitogens with potent angiogenic activity. Trends Biochem. Sci. 11:81-84.

**THOMPSON W.P., CAMPBELL R. et EVANS T. (1985)** Fibrin degradation and angiogenesis: quantitative analysis of the angiogenic responses in the chick chorioallantoic membrane. J. Pathol. 145:27-37.

**THOMPSON J.A., ANDERSON K.D., DIPIETRO J.M., ZWEIBEL J.A., ZAMETTA M., ANDERSON W.F. et MACIAG T. (1988)** Site-directed neovessel formation in vivo. Science 241:1349-1352.

**TOBELEN G.** (1990) L'angiogenèse tumorale. Medecine/Sciences 6:426-432.

**TODARO G.J., FRYLING C. et DELARCO J.E.** (1980) Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5258-5262.

**TOWBIN H., STAEHELIN T. et GORDON J.** (1979) Electrophoretic transfert of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

**TUCKER R.F., SHIPLEY G.D., MOSES H.L. et HOLLEY R.W.** (1984a) Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. Science 226:705-707.

**TUCKER R.F., BRANUM E.L., SHIPLEY G.D., RYAN R.J. et MOSES H.L.** (1984b) Specific binding to cultured cells of <sup>125</sup>I-labeled type β transforming growth factor from human platelets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6757-6761.

**VAITUKATIS J., ROBBINS J.B., NIESCHIAG E. et ROSS G.T.** (1971) A method for producing specific antibodies with small doses of immunogen. J. Clin. End. 33:988-991.

**VLODAVSKY I., FUKS Z., BAR-NER M., ARIAV Y. et SCHVIRMACHER V.** (1983) Lymphoma cell mediated degradation of sulfated proteoglycans

in the subendothelial cell extracellular matrix: relationship to tumor metastatic. Cancer Res. 43:2704-2711.

VLODAVSKY I., FOLKMAN J., SULLIVAN R., FRIDMAN R., SHAI-MICHAELI R., SASSE J. et KLAGSBRUN M. (1987) Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor; synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2292-2296.

WAGNER R.C. (1980) Endothelial cell embryology and growth. Adv. Microcirc. 9:45-75.

WAHL S.H., HUNT D.A., WAKEFIELD L.M., Mc CARTNEY-FRANCIS N., WAHL L.M., ROBERTS A.B. et SPORN H.B. (1987) Transforming growth factor beta (TGF-beta) induces monocyte chemotaxis and growth factor production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5788-5792.

WAKEFIELD L.M., SMITH D.M., MASUI T., HAPRIS C.C. et SPORN M.B. (1987) Distribution and modulation of the cellular receptor for transforming growth factor-beta. J. Cell Biol. 105:965-975.

WEINER H.L., WEINER L.H. et SWAIN J.L. (1987) Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. Science 237:280-282.

WEISS J.B., BROWN R.A., KUMAR S. et PHILIPPS P. (1979) An angiogenic factor isolated from tumors - a potent low-molecular-weight compound. Br. J. Cancer 40:493-496.

WEREMOWICZ S., FOX E.A., MORTON C.C. et VALLEE B.L. (1990) Localization of the human angiogenin gene to chromosome band 14p11, proximal to the T cell receptor  $\alpha/\delta$  locus. Amer. J. Hum. Genet. 47:973-981.

WINKLES J.A., FRIESEL R., BURGESS W.H., HOWK R., MEHLMAN T., WEINSTEIN R. et MACIAG T. (1987) Human vascular smooth muscle cells both express and respond to heparin-binding growth factor I (endothelial cell growth factor). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7124-7128.

WLODAWER A., BOTT R. et SJÖLIN L. (1982) J. Biol. Chem. 257:1325-1332.

WLODAWER A., SVENNON L.A., SJÖLIN L. et GILLILAND G.L. (1988) Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 Å. Biochemistry 27:2705-2717.

WONG H.L. et WAHL S.M. (1990) Inflammation and repair; In: Sporn M.B. et Roberts A.B. (eds) "Peptide growth factors and their receptors II". Springer-Verlag, pp 509-548.

YARDEN Y. et ULLRICH A. (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu. Rev. Biochem. 57:443-478.

ZAGZAG D., GOLDENBERG H. et BREM S. (1979) Angiogenesis and blood-brain barrier breakdown modulate CT contrast enhancement: an experimental study in a rabbit brain-tumor model. Amer. J. Roentgenol. 153:141-146.

ZETTER B.R. (1980) Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor-derived factors. Nature 285:41-43.

ZETTER B.R. (1981) The endothelial cells of large and small blood vessels. Diabetes Suppl. 30:24-28.

ZETTER B.R. (1988) Endothelial heterogeneity: influence of vessels size, organ localization and species specificity on the properties of cultured endothelial cells. "Endothelial cells" Vol II, Una Ryan Ed., CRC Press Inc, Boca Raton Florida, 63-79.

ZICHE M., JONES J. et GULLINO P. (1982) Role of prostaglandin  $E_1$  and copper in angiogenesis. J. Natl. Cancer Inst. 69:475-482.

