

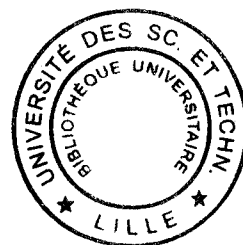
Université des Sciences et Technologies de Lille

THESE

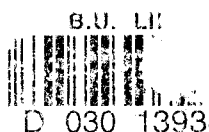
**présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université en Sciences de la Vie et de la Santé**

Par

Virginie Mattot



**Etude du rôle des membres de la famille Ets dans les cellules
endothéliales**



Soutenue le 9 Décembre 1997 devant le jury composé de :

Pr. Jean-Pierre Vilain	Président
Dr. Jean Plouët	Rapporteur
Dr. Pierre Rémy	Rapporteur
Pr. Dominique Stéhelin	Examineur
Dr. Bernard Vandebunder	Examineur, Directeur de Thèse

Remerciements

Au Président du jury:

J'adresse mes remerciements pour me faire l'honneur de présider le jury de ma thèse.

A Messieurs Jean Plouët et Pierre Rémy :

J'adresse toute ma gratitude pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture, à la correction et au jugement de ce manuscrit.

A Dominique Stéhelin :

Je témoigne toute ma reconnaissance pour m'avoir ouvert les portes du Laboratoire d'Oncologie Moléculaire où j'ai réalisé mes premiers pas dans la recherche.
Ses conseils m'ont aussi permis de garder confiance pendant ces derniers mois.

A Bernard Vandebunder :

Je présente mes remerciements pour m'avoir intégrée dans son équipe et avoir eu suffisamment d'audace pour croire en l'avenir d'une étudiante au cursus peu classique.
La liberté de travail et l'autonomie qui m'ont été octroyées vont contribuer à m'adapter rapidement à la situation de post-doc que je me prépare à affronter.

A Fabrice Soncin:

J'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir "propulsée" dans le monde de l'angiogénèse.
Ses connaissances scientifiques et informatiques m'ont été précieuses.
L'épreuve finale aurait été beaucoup plus difficile sans son aide et ses encouragements.

A Christelle Huguet:

J'exprime tous mes remerciements non seulement pour son soutien scientifique qui m'a toujours permis d'avancer mais également pour son amitié unique.
J'espère que nous conserverons longtemps cette complicité.
Alors, à très bientôt sur le *email*.

A Véronique Fafeur:

Je témoigne toute ma gratitude pour avoir accepté de discuter et de partager son point de vue avec moi tout au long de ces années passées au laboratoire.
Le sujet n'aurait pas évolué de la même manière sans ces échanges.

A Chantal Vercamer:

Je présente toute ma gratitude pour m'avoir aidée à mener à bien ce travail.
Notre binôme a été efficace.

A tous mes ami(e)s du labo:

J'exprime tous mes remerciements, tout simplement pour avoir été mes ami(e)s. Vous avez tous été essentiels à mon bien être au sein du laboratoire.

A ceux qui ne sont pas dans les murs du laboratoire

Des personnes extérieures au laboratoire m'ont beaucoup aidée à "survivre" dans la jungle scientifique.

Mes parents ont tenu le rôle principal dans cette tâche difficile.

Je les remercie infiniment pour l'attention qu'ils m'ont toujours portée.

Leur soutien, leur confiance et leur aide m'ont permis d'affronter sans trop de dommages toutes les épreuves à traverser.

J'ai puisé en eux toute la force nécessaire pour harmoniser au mieux une vie scientifique et une vie sociale.

Je tiens également à remercier mon frère, mon compagnon de "galère".

Cette fois ci encore, il m'a démontré combien son soutien m'était vital.

Enfin je remercie tous ceux qui m'ont apporté à un moment ou à un autre leur amitié et leur appui. Ils m'ont ainsi toujours permis de poursuivre mon chemin.

Publications

V. Mattot, M. B. Raes, P. Henriët, Y. Eeckhout, D. Stéhelin, B. Vandebunder and X. Desbiens.

Expression of *interstitial collagenase* is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis.

(1995) **Journal of Cell Science** 108, 529-535. *

V. Fafeur, D. Tulasne, C. Quéva, C. Vercamer, V. Dimster, S. Ansieau, **V. Mattot**, D. Stéhelin, X. Desbiens and B. Vandebunder.

The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-stimulated MDCK epithelial cells

(1997) **Cell Growth and Differentiation** 8 (6), 655-665.

C. Huguet, **V. Mattot**, F. Bouali, D. Stéhelin, B. Vandebunder and C. Abbadie.

The avian transcription factor c-Rel is induced and translocates into the nucleus of thymocytes undergoing apoptosis.

(1997) **Cell Death and Differentiation** 4, 413-422.

V. Mattot, C. Vercamer, T. Calmels, C. Huguet, F. Soncin, V. Fafeur and B. Vandebunder
Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and spreading and impairs the formation of capillary-like structures on Matrigel (soumis). *

A. Delannoy-Courdent, **V. Mattot**, V. Fafeur, W. Fauquette, I. Pollet, B. Boilly, B. Vandebunder and X. Desbiens.

Constitutive expression of a dominant negative mutant in murine mammary epithelial cells inhibits uPA expression and activity and impairs tubular morphogenesis and neoplastic scattering.

(en préparation).

Revues

T.P.G. Calmels, **V. Mattot**, N. Wernert, B. Vandebunder and D. Stéhelin.

Invasive tumors induce c-ets1 transcription factor expression in adjacent stroma.

(1995) **Biol.Cell.** 84,53-61.

V. Mattot and B. Vandebunder.

New potential inhibitors of tumor angiogenesis.

(1997) **Bull Cancer (Paris)** 84(4):447-450.

V. Mattot, A. Pourtier, F. Soncin et B. Vandebunder.

La morphogenèse de l'arbre vasculaire

De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques

(soumis).

* Publications présentées dans ce mémoire.

Présentation du mémoire

Les échanges entre l'organisme et le monde extérieur sont une nécessité absolue.

Dans le règne animal, chez les métazoaires primitifs, à l'exception des Némertiens, les échanges gazeux se font directement à travers les téguments; les échanges nutritifs se font par la traversée des épithéliums digestifs. Avec l'augmentation de la complexité de l'organisme, la mise en place d'un système spécialisé dans les échanges nutritifs et gazeux s'est imposée. Afin de garantir ces échanges, dès les triploblastiques coelomates, en particulier les Annélides, se met en place le système circulatoire.

La mise en place de ce réseau vasculaire est fondamentale pour le développement de l'organisme et la moindre défaillance dans le processus peut s'avérer fatale pour l'individu comme en témoignent les nombreuses expériences de recombinaisons homologues provoquant des anomalies vasculaires et la mort des embryons de souris. Chez l'adulte, un défaut du système cardio-vasculaire a aussi de fâcheuses conséquences. D'autre part, le système vasculaire, par son développement ou sa régression, intervient dans de nombreuses affections.

N'en doutons pas le moindre progrès pour comprendre la mise en place du réseau vasculaire peut avoir à long terme des retombées médicales importantes.

Nous avons donc choisi d'introduire dans ce mémoire les connaissances acquises dans le domaine de la mise en place des vaisseaux sanguins afin de définir les acteurs et les interactions mis en jeu dans ce processus. Dans un deuxième temps, nous avons présenté la famille des facteurs de transcription Ets et plus particulièrement Ets1 qui a suscité notre intérêt au cours de ce travail de thèse pour son rôle dans le processus angiogénique. Cette présentation du facteur de transcription Ets1 a été réduite aux propriétés générales de la molécule et à ses éventuelles fonctions dans différents processus biologiques et notamment l'angiogenèse. De nombreux points concernant la famille Ets n'ont pas été abordés mais ont fait récemment l'objet de revues très complètes.

Nos travaux, focalisés sur la fonction d'un facteur de transcription dans le processus angiogénique sont présentés dans ce mémoire en deux parties. Dans la première, nous apportons de nouvelles données et de nouvelles hypothèses sur un rôle éventuel de Ets dans l'angiogenèse. Dans la deuxième, des travaux supplémentaires sont présentés ; ceux ci apporteront peut être plus tard de nouveaux indices sur l'implication du facteur de transcription dans l'angiogenèse.

Table des matières

Introduction

I. LE SYSTÈME VASCULAIRE	11
A. LA DIVERSITÉ DE L'ARBRE VASCULAIRE DANS L'ORGANISME.....	11
1. <i>L'hétérogénéité structurale des vaisseaux sanguins</i>	11
a) De gros vaisseaux à fonction de transport	11
b) Des capillaires à fonction d'échanges.....	12
2. <i>L'hétérogénéité des endothéliums</i>	13
a) Les endothéliums capillaires : continus, discontinus et fenestrés.....	14
b) Les propriétés des cellules endothéliales	15
1) Variation de synthèse des composants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale.....	15
2) Variation de la surface cellulaire	15
c) Les jonctions entre cellules endothéliales	15
1) La jonction serrée	17
2) La jonction ouverte ou gap junction	17
3) La jonction adhérente ou zonula adhérente	17
4) Les autres molécules intervenant dans les jonctions cellulaires.....	18
B. LE DÉVELOPPEMENT DES VAISSEaux SANGUINS	19
1. <i>La vasculogénèse</i>	19
a) Différenciation des angioblastes à partir du mésoderme	19
b) Formation du plexus vasculaire primaire	21
c) La régulation de la vasculogénèse.....	23
1) L'induction du mésoderme et la différenciation des précurseurs.....	23
2) Le premier réseau vasculaire	24
2. <i>L'angiogénèse</i>	24
a) Angiogénèse embryonnaire ou chez l'adulte	24
1) Chez l'embryon	24
2) Chez l'adulte : situations normales ou pathologiques :	25
i) L'angiogénèse adulte normale.....	25
ii) L'angiogénèse adulte pathologique	25
b) Chronologie des événements morphologiques de l'angiogénèse	26
1) Bourgeoisement de nouveaux vaisseaux à partir du réseau primaire de capillaires	26
2) Remodelage de la structure vasculaire développée	27
3) La maturation des vaisseaux	27
c) Les acteurs moléculaires impliqués dans le développement des vaisseaux	28
1) La stimulation de l'angiogénèse	28
i) Les facteurs angiogéniques et leurs récepteurs.....	28
ii) Les facteurs anti-angiogéniques	34
2) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire.....	37
3) La migration et la prolifération des cellules endothéliales	39
4) L'adhérence des cellules endothéliales.....	40
i) Les récepteurs d'adhérence :	40
ii) Les molécules de pontage entre le récepteur et le cytosquelette :	43
5) La morphogénèse et la maturation des capillaires	45
C. POURQUOI TENTER DE CONTRÔLER LE PROCESSUS ANGIOGÉNIQUE ?.....	48
a) Quels sont les intérêts de réussir à contrôler l'angiogénèse :	48
II. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET L'ANGIOGÉNÈSE	50

A. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 ET LES MEMBRES DE SA FAMILLE.....	51
B. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION AP-2.....	51
C. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION GATA-2 ET GATA-3	52
D. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE NF-κB ET LEURS INHIBITEURS IκB	52
E. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION ETS1 ET LES MEMBRES DE SA FAMILLE.....	53
III. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION DE LA FAMILLE ETS	53
A. DÉCOUVERTE DE ETS1 ET NAISSANCE D'UNE GRANDE FAMILLE.....	53
B. L'ORGANISATION DU GÈNE ET LES DOMAINES PROTÉIQUES FONCTIONNELS	54
1. <i>Le gène ets1</i> :	54
2. <i>Les domaines fonctionnels de Ets1</i>	55
a) Le domaine de liaison à l'ADN ou domaine ETS	55
b) Le domaine transactivateur	57
c) Les domaines régulateurs de la fixation à l'ADN.....	57
C. LES RÉGULATIONS DE L'ACTIVITÉ DE ETS1	57
1. <i>Les phosphorylations de la protéine</i>	58
2. <i>Les co-facteurs de Ets1</i>	58
D. DES FONCTIONS ENCORE PEU CONNUES :.....	59
1. <i>Les protéines Ets1 et l'hématopoïèse</i>	59
a) Le rôle de Ets1 dans les cellules érythroïdes et myéloïdes	59
b) Le rôle de Ets1 dans les cellules lymphoïdes	60
2. <i>Les protéines Ets1 et les processus migratoires et invasifs</i>	61
a) l'expression de ets1 au cours des processus migratoires et invasifs.....	61
b) Des gènes cibles de ets1 impliqués dans le remodelage extra-cellulaire.....	61
3. <i>Les membres de la famille Ets1 et le développement des vaisseaux sanguins</i>	62
a) L'expression des facteurs de transcription Ets et le développement des vaisseaux sanguins.....	62
b) Un rôle hypothétique pour Ets1 au cours de la vasculogénèse et l'angiogénèse.....	63

Première Partie:

Première publication:

1. <i>Une expression tardive et restreinte de la collagénase interstitielle (MMP-1) au cours du développement</i>	66
2. <i>Une activité protéolytique soumise à un contrôle strict</i>	67
3. <i>Des hypothèses sur la régulation transcriptionnelle de la collagénase interstitielle</i>	67

Deuxième publication:

1. <i>Le choix des outils</i>	100
2. <i>La prolifération et la migration des cellules endothéliales ne sont pas affectées par l'expression de Ets1-DB</i> :	102
3. <i>L'adhérence des cellules endothéliales est augmentée par l'expression de la protéine Ets1-DB</i> :	103
4. <i>Une adhérence accrue mais une migration non perturbée</i> :	105
5. <i>Des cellules susceptibles d'apporter encore de nombreuses informations</i>	106

Deuxième partie:

I. L'UTILISATION DES RÉTROVIRUS DANS UN MODÈLE D'ANGIOGENÈSE *IN VIVO* :..... 108

II. AUTRES CONSTRUCTIONS RÉTROVIRALES RÉALISÉES : 114

Références bibliographiques:.....118

Abréviations.

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
BSA : *Bovine Serum Albumin*, Albumine bovine sérique
CAM : Membrane chorio-allantoïdienne d'embryon de poulet
Co43, Co40, Co37 : connexine 43, 40, 37
Coll : collagène
DMEM : *Dulbecco's Modified Minimum Essential Medium*
DMSO : Dimethyl sulfoxyde
dpc: *day post coitum*, jour après accouplement
EBS : *ETS-binding site*, site de fixation à ETS
EGF : *Epidermal growth factor*, facteur de croissance de l'épiderme
ETS : *Erythroid twenty-six*
ETS-DB : mutant dominant négatif de la fixation à l'ADN de ETS
FN : fibronectine
FG : fibrinogène
FGF : *Fibroblast growth factor*, facteur de croissance des fibroblastes
G-CSF : *granulocyte colony stimulating factor*
GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*
HeLa : cellules épithéliales humaines dérivées d'un carcinome du col de l'utérus
HIF : *Hypoxia inducible factor*, facteur inductible par l'hypoxie
IGF : *insulin-like growth factor*
IgG : Immunoglobuline gamma
IL-1, -8 : Interleukine-1, -8
IP10 : *interferon gamma-inducible protein 10*
Lam : laminine
LIBE : Cellules endothéliales murines, de capillaires de cerveau
LTC4 : leucotriène C4
MAE : *Mouse aortae endothelial cells*, cellules endothéliales d'aorte de souris
MEM : *Minimum Essential Medium*
MFG : *Moloney murine leukemia virus*, virus de leucémie murine de Moloney
MMP : Metalloproteinase
PAI : *Plasminogen Activator-Inhibitor*
PBS : *Phosphate buffered saline*, tampon phosphate physiologique
PCR : *Polymerase chain reaction*, réaction de polymérisation en chaîne
PD-ECGF : *Platelet-Derived Endothelial cell Growth Factor*, facteur de croissance des cellules endothéliales dérivé des plaquettes
PDGF : *Platelet-Derived Growth Factor*, facteur de croissance dérivé des plaquettes
PECAM : *Platelet-endothelial cell adhesion molecule*. Molécule d'adhérence des plaquettes-endothéliales
PF4 : *Platelet factor 4*
PGE : prostaglandine E
PRI : *Placental Ribonuclease Inhibitor*, Inhibiteur placentaire de la ribonucléase.
SC/P : Injection sous-cutanée ou péritonéale
SF/HGF : *Scatter factor/Hepatocyte growth factor*, facteur de dissociation/facteur de croissance des hépatocytes
TGF : *Transforming Growth Factor*, facteur de croissance transformant.

TIMP : *Tissue Inhibitor of Metallo Protease*, Inhibiteur Tissulaire de métalloprotéase
TNF : *Tumor Necrosis Factor*, facteur de nécrose des tumeurs
uPA, tPA : urokinase, tissu plasminogen activator
TPA : 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TSP : thrombospondine
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*, facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
VEGFR : récepteur au VEGF
VN : vitronectine
vWF : facteur von Willebrand
ZO-1, -2 : Zonula occludens 1, 2

Abus de langage

Je prie le lecteur de bien vouloir pardonner l'utilisation dans ce mémoire de certains termes anglais, mentionnés en italique, qui pour des raisons de compréhension ont été préférés aux termes équivalents français dont l'utilisation est plus rare.

Introduction

I. Le système vasculaire

Chez l'embryon de Vertébrés, le système cardio-vasculaire est un des premiers systèmes fonctionnels qui se met en place. Du système vasculaire qui se développe dépendront le transport des nutriments et des gaz, la différenciation des organes et finalement toute la croissance de l'embryon. Dans l'organisme adulte, les fonctions embryonnaires du système circulatoire sont conservées puisque les voies vasculaires servent toujours à véhiculer les nutriments ainsi qu'à permettre les échanges gazeux. De plus, en transportant à travers l'organisme l'ensemble des informations (en particulier les hormones) nécessaires au fonctionnement des différents organes, le système circulatoire adulte devient un circuit de communication majeur pour l'individu.

A. La diversité de l'arbre vasculaire dans l'organisme

1. L'hétérogénéité structurale des vaisseaux sanguins

L'arbre vasculaire est constitué de différents vaisseaux dont la structure varie afin d'assurer les trois fonctions suivantes :

- le transport du sang depuis le coeur vers les différents organes
- les échanges gazeux, liquides et nutritifs au niveau des tissus
- le retour du sang vers le coeur

Globalement, les gros vaisseaux à fonction de transport du sang (artères et veines) possèdent des propriétés élastiques indispensables à leur fonction ainsi qu'une structure musculaire impliquée dans la régulation du flux sanguin. Les capillaires ne participant pas à cette régulation mais plutôt à l'établissement des échanges, sont dépourvus de cette structure musculaire et possèdent une perméabilité indispensable à leur fonction.

a) De gros vaisseaux à fonction de transport

Du point de vue histologique, une organisation de base comprenant trois structures définit la paroi des gros vaisseaux. La structure interne, appelée intima, est composée d'une couche unique de cellules endothéliales, bordant la lumière du vaisseau, qui reposent sur une membrane basale et du tissu conjonctif. La couche intermédiaire, ou média, est formée de cellules musculaires lisses. Enfin, le tissu conjonctif externe constitue l'adventice et donc la structure extérieure délimitant le vaisseau (Figure 1). La membrane basale sur laquelle reposent les cellules endothéliales est une structure non cellulaire dont les constituants majeurs sont la laminine, le collagène de type IV, les protéoglycannes de type héparane sulfate, l'entactine, le facteur Von Willebrand, la vitronectine et la fibronectine. Le tissu conjonctif présent dans

l'intima et dans l'adventice comprend une partie cellulaire (des fibroblastes chargés de produire les éléments extra-cellulaires du tissu conjonctif, des adipocytes à fonction de stockage et des cellules impliquées dans le système immunitaire) et une matrice extra-cellulaire composée de collagènes de types I, III, V et VII, de fibronectine, de thrombospondine, d'élastine, de chondroïtine sulfate et de protéoglycannes de type dermatane sulfate.

Dans la paroi de ces vaisseaux sanguins, des interactions entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses localisées respectivement dans l'intima et dans la media se mettent en place. Ainsi, les cellules endothéliales exercent un contrôle sur la capacité de prolifération des cellules musculaires lisses. Dans des expériences d'élimination de l'endothélium sur une partie de la carotide de rat, les cellules musculaires lisses se mettent à proliférer et leur prolifération cesse quand l'endothélium est à nouveau formé. Parallèlement, du milieu conditionné préparé à partir de cellules endothéliales à confluence inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses, tandis que à l'inverse, du milieu conditionné préparé à partir de cellules endothéliales en culture à faible densité favorise leur prolifération (revue Karnovsky, 1981).

b) Des capillaires à fonction d'échanges

Seule l'intima est présente au niveau des capillaires dont la paroi est alors limitée aux cellules endothéliales, à la membrane basale et à d'autres cellules voisines, les péricytes (Figure 1). Des études *in vitro* ont mis en évidence des interactions entre ces péricytes et les cellules endothéliales. La co-culture entre cellules endothéliales et péricytes provoque une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales (Orlidge and D'Amore, 1987) ainsi que l'inhibition de la migration de ces cellules (Sato and Rifkin, 1989). L'activation du TGF- β 1 (*transforming growth factor β 1*), un facteur de croissance produit par les cellules lorsqu'elles sont seules en culture, est induite lors de la co-culture et est à l'origine de ces inhibitions (Antonelli-Orlidge et al., 1989; Hirschi and D'Amore, 1997). L'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales au contact des péricytes ne constituerait pas les seules activités médiées par le TGF- β 1. Des dégradations de composants de la matrice extra-cellulaire pourraient également survenir suite à l'interaction entre ces cellules (Hirschi and D'Amore, 1997).

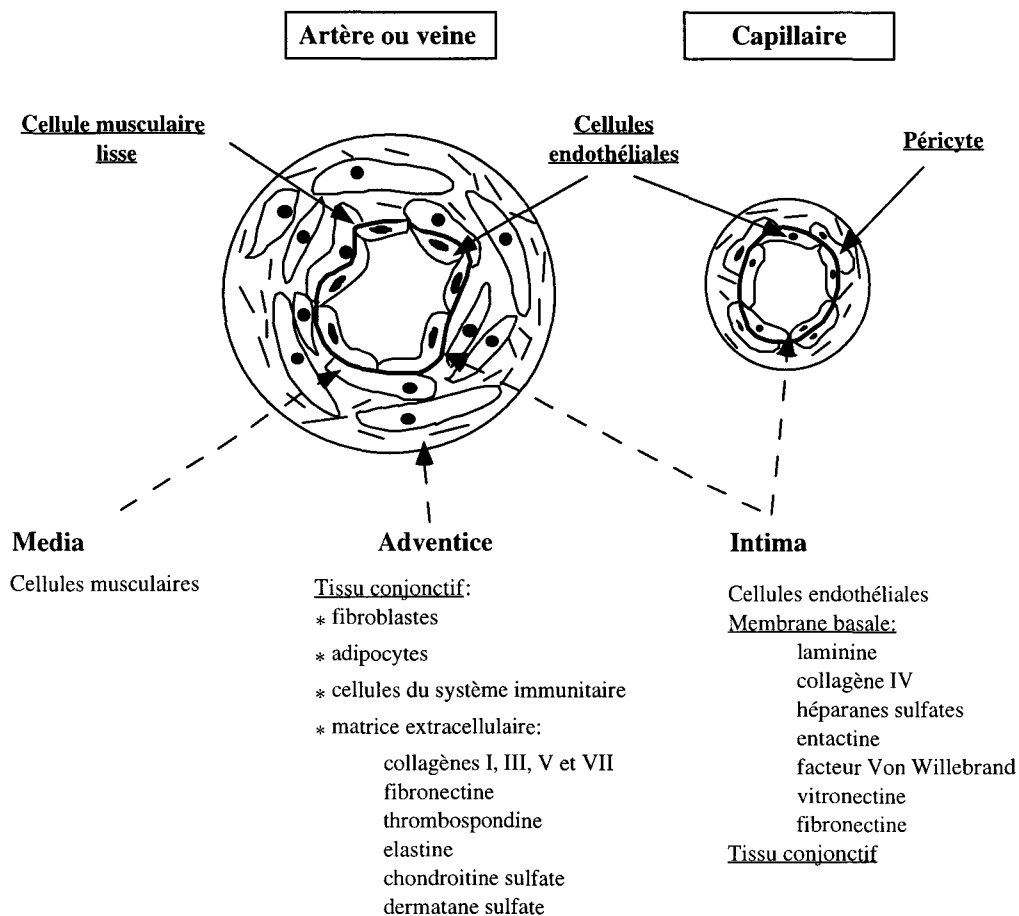


Figure 1 : La structure des vaisseaux sanguins

L'organisation structurale des vaisseaux sanguins est variable entre les artères et veines ou les capillaires. Les variations portent non seulement sur les cellules formant les vaisseaux mais également sur les composants extra-cellulaires responsables de l'élasticité des vaisseaux.

2. L'hétérogénéité des endothéliums

La diversité des vaisseaux sanguins ne se limite pas à des variations histologiques, elle peut également s'observer au niveau même des caractéristiques physiologiques de l'endothélium. En effet, la mono-couche de cellules endothéliales qui borde tous les vaisseaux sanguins n'a pas des propriétés identiques dans tous les tissus. Dans l'organisme adulte, les endothéliums capillaires peuvent être continus, discontinus ou fenestrés. De même, les cellules endothéliales formant ces endothéliums présentent des caractéristiques particulières suivant leur origine. Elles sécrètent différemment les composants de la membrane basale ou de la matrice extra-cellulaire, leur surface cellulaire n'est pas homogène et enfin les jonctions intercellulaires peuvent être variables.

a) Les endotheliums capillaires : continus, discontinus et fenestrés

Trois types de capillaires ont été définis selon leurs différences morphologiques mises en évidence par des analyses ultra-structurales. Une continuité cytoplasmique caractérise les cellules endothéliales des capillaires continus, ce qui est d'ailleurs à l'origine de leur dénomination. En effet, les membranes apicale et basale de ces cellules endothéliales ne se rejoignent ni ne fusionnent en aucun point à l'exception des jonctions cellulaires (Figure 2). A l'inverse, des pores de diamètre compris entre 80 et 200 nm caractérisent les capillaires discontinus et fenestrés et leur confèrent ainsi leur perméabilité moins spécifique (revue Risau, 1995). De plus, dans les capillaires fenestrés (dont la structure a été décrite par Friederici, 1968), les pores sont également munis de diaphragmes (Figure 2).

Une étroite relation existe entre la structure du capillaire et sa fonction. En effet, les capillaires continus, dont la perméabilité est très contrôlée, sont localisés, entre autres, dans le système nerveux central et forment la barrière hémato-encéphalique. En revanche, les capillaires fenestrés, dont la perméabilité sélective en faveur des molécules hydrophiles de bas poids moléculaire a été démontrée (Levick and Smaje, 1987), se situent dans les zones de filtration, de sécrétion et d'absorption (le rein, les glandes endocrines, le tractus gastro-intestinal et le plexus choroïde dans le cerveau). Enfin, les capillaires discontinus perforés de pores permettant des échanges de particules de haut poids moléculaire sont localisés dans le foie, la moelle osseuse et la rate.

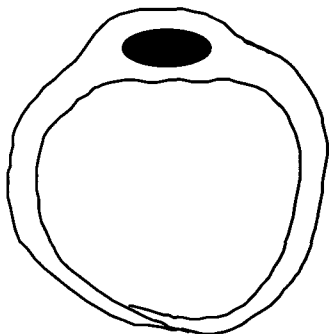
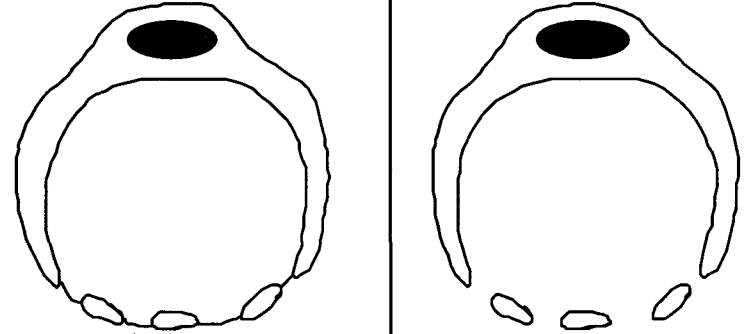
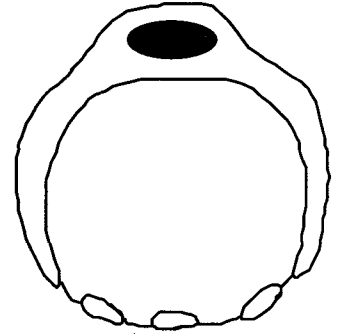
Capillaire continu	Capillaire discontinu	
	Capillaire fenestré	
	 <p data-bbox="534 1747 682 1791">Diaphragme</p>	
Perméabilité limitée	Perméabilité sélective	Perméabilité élevée

Figure 2: Les capillaires continus ou discontinus

Les capillaires continus ne sont pas munis de pores permettant le passage de molécules ce qui implique que tous les échanges passent par les cellules endothéliales elles mêmes et sont rigoureusement contrôlés.

Les capillaires fenestrés possèdent des pores munis de diaphragmes qui assurent une sélectivité des échanges. Les capillaires discontinus possèdent des pores responsables d'une perméabilité peu sélective.

b) Les propriétés des cellules endothéliales

1) *Variation de synthèse des composants de la matrice extra-cellulaire et de la membrane basale*

Dans le milieu de culture, les cellules endothéliales issues de l'aorte ou de veines de boeuf sécrètent les mêmes composants de la matrice extra-cellulaire ou de la membrane basale (la fibronectine, les collagènes de type III, IV et V, et la thrombospondine), en revanche les cellules endothéliales issues de capillaires sécrètent davantage de collagènes (50% des protéines sécrétées sont du collagène et principalement des collagènes de types I et III). La fibronectine et la thrombospondine sont également sécrétées par ces cellules endothéliales de capillaire (Sage et al., 1981).

2) *Variation de la surface cellulaire*

Suivant leur tissu d'origine, la membrane des cellules endothéliales peut présenter des propriétés très variables. Cette variabilité s'observe en particulier lorsque l'adhérence de cellules tumorales est mesurée sur des tapis confluent de cellules endothéliales d'origines diverses. Ainsi, des cellules de gliome adhèrent préférentiellement aux cellules endothéliales de capillaire du cerveau, des cellules de tératome aux cellules endothéliales dérivées de l'ovaire (Alby and Auerbach, 1984). D'autres expériences ont démontré l'association préférentielle entre les cellules tumorales isolées d'un organe particulier et les cellules endothéliales issues de vaisseaux sanguins de ce même organe (Auerbach et al., 1987; Nicolson, 1988; Nicolson, 1988). Les variations à la surface des cellules endothéliales sont aussi probablement responsables des difficultés rencontrées, dans de nombreux travaux, pour obtenir un marqueur efficace des vaisseaux sanguins. Ce problème est parfaitement illustré par une étude systématique de l'efficacité de différents marqueurs de cellules endothéliales sur de nombreux tissus (Kuzu et al., 1992). Les auteurs démontrent que l'efficacité de marquage des vaisseaux sanguins par des anticorps dirigés contre le facteur Von Willebrand, le CD31 et le CD34 sont variables surtout selon la maturité du vaisseau. D'après ces travaux, le marqueur le plus efficace actuellement connu pour détecter les vaisseaux sanguins reste l'anticorps dirigé contre le CD31 (PECAM).

c) Les jonctions entre cellules endothéliales

Les vaisseaux sanguins ont une fonction d'échange dans l'organisme par l'apport de nutriments ou l'élimination des déchets. Ces échanges sont en partie assurés par un transport des

molécules à travers les cellules endothéliales ou par l'intermédiaire des pores cellulaires (quand ils existent) mais aussi au niveau des jonctions entre les cellules endothéliales le long de l'arbre vasculaire. Ces jonctions sont souples et peuvent être organisées ou désorganisées en une minute. Elles sont plus ou moins complexes ce qui confère aux vaisseaux sanguins une perméabilité variable (revue Dejana et al., 1995). Les jonctions sont nombreuses et très étroites au niveau des vaisseaux sanguins du cerveau là où un contrôle précis des échanges est indispensable alors qu'elles sont peu nombreuses et lâches dans les zones d'échanges abondants (Simionescu and Simionescu, 1991). Quatre types de jonctions ont été décrites dans les cellules endothéliales : les jonctions serrées, les jonctions ouvertes de type *gap*, les jonctions adhérentes et les *syndesmos*. Ces jonctions sont toutes composées d'un réseau complexe de protéines transmembranaires associées à des protéines cytoplasmiques (Figure 3).

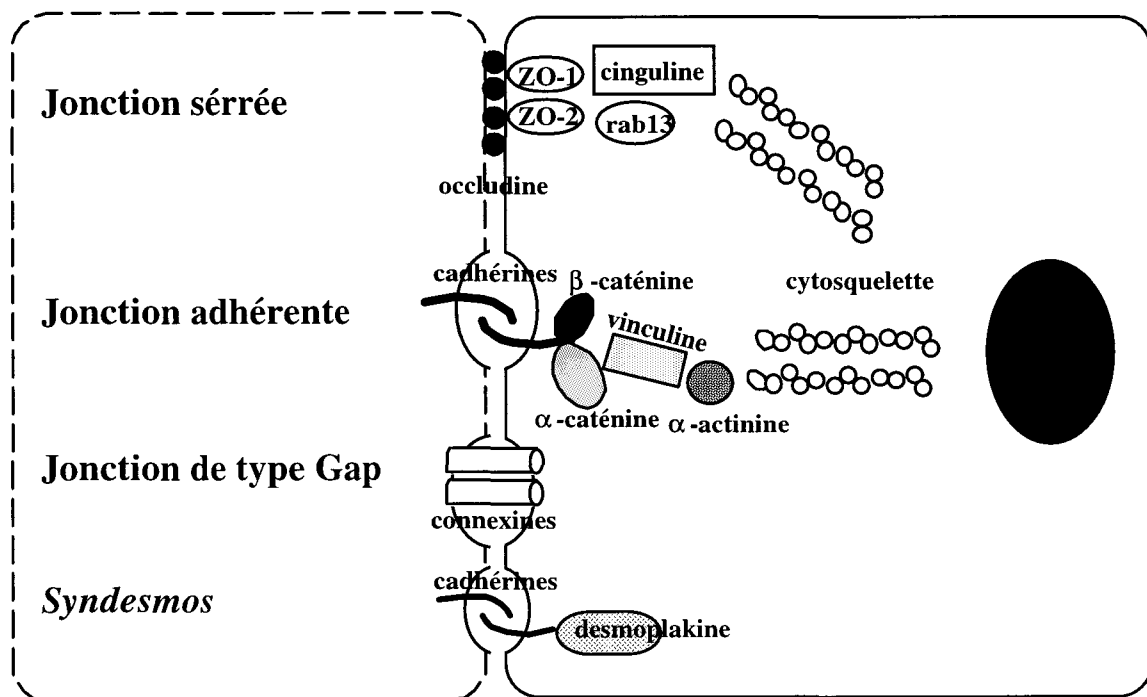


Figure 3: Les jonctions des cellules endothéliales

Quatre types de jonctions ont été définies : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions de type gap et les jonctions de type *syndesmos*. Différents composants cytoplasmiques et transmembranaires assurant le maintien de ces jonctions sont déjà connus ainsi que leurs relations avec le cytosquelette.

1) La jonction serrée

Cette jonction, comme son nom l'indique, est responsable de contacts étroits entre les cellules endothéliales d'un vaisseau sanguin. Son étanchéité n'est pas absolue puisque des pores peuvent l'interrompre pour laisser passer sélectivement des molécules (revue Anderson et al., 1993). Ce type de jonction est fréquent au niveau des artères et pratiquement absent des petits vaisseaux comme les veinules. L'occludine est la seule protéine transmembranaire actuellement connue spécifiquement présente dans ces jonctions serrées (Furuse et al., 1993). Des analyses en immunocytochimie ont montré que l'occludine est abondante et répartie de façon continue au niveau de la jonction serrée dans les cellules endothéliales du cerveau alors qu'elle est peu présente et répartie de façon discontinue dans les autres cellules endothéliales étudiées. Elle pourrait avoir une fonction dans la perméabilité des jonctions serrées (Hirase et al., 1997). Les protéines ZO-1 et ZO-2 (zonula occludens 1 et 2, Gumbiner et al., 1991; Li and Poznansky, 1990) la cinguline (Citi et al., 1988), la protéine antigène de l'anticorps 7H6 (Sato et al., 1996; Zhong et al., 1993), la petite protéine G rab13 (Zahraoui et al., 1994), correspondent aux éléments cytoplasmiques qui forment ces jonctions (Figure 3). Les relations entre toutes ces protéines membranaires et transmembranaires restent encore aujourd'hui peu connues.

2) La jonction ouverte ou gap junction

Ces jonctions ouvertes s'organisent en groupes de canaux transmembranaires qui permettent la diffusion des ions et des petites molécules entre cellules voisines. Les échanges intercellulaires passant par ces jonctions ouvertes sont peu sélectifs en raison du diamètre important des canaux transmembranaires (Beyer et al., 1990). Ces jonctions jouent alors un rôle fondamental non seulement dans les communications des cellules endothéliales entre elles mais également dans les communications entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses ou les macrophages (Polacek et al., 1993). La répartition de ces jonctions au niveau des vaisseaux sanguins se superpose à celle des jonctions serrées ; en général, ces deux types de jonctions s'alternent (Simionescu and Simionescu, 1991). Les protéines de la famille des connexines notamment Co43, Co40 et Co37 (Beyer, 1993) participent à la structure de ces canaux transmembranaires dans les cellules endothéliales (Figure 3).

3) La jonction adhérente ou zonula adhérens

Au niveau de ce type de jonctions, les contacts membranaires entre les cellules endothéliales sont assurés par les cadhérines, des glycoprotéines transmembranaires. Ces

glycoprotéines sont en relation avec les caténines, protéines cytoplasmiques, qui elles mêmes assurent une liaison avec le cytosquelette. Par ailleurs, les cadhérines peuvent également s'associer à la zyxine ou la moésine, deux protéines de pontage avec le cytosquelette (revue Dejana et al., 1995). Plusieurs cadhérines sont exprimées par les cellules endothéliales, la N-cadhérine (qui s'exprime principalement dans les cellules nerveuses et les cellules musculaires) mais son rôle dans les jonctions cellulaires reste discutable puisqu'elle n'a pas été détectée au niveau membranaire (Alexander et al., 1993; Salomon et al., 1992), la P-cadhérine dont les ARNs ont été détectés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dans les cellules endothéliales mais dont l'expression protéique n'est pas démontrée (Liaw et al., 1990), la E-cadhérine, présente dans les endothéliums du cerveau (Rubin et al., 1991) et la VE-cadhérine ou cadhérine-5 spécifique des cellules endothéliales (Lampugnani et al., 1992). Différentes caténines peuvent interagir avec les cadhérines, la β -caténine ou la γ -caténine (connue également sous le nom de plakoglobine). Ces deux dernières, en s'associant à l' α -caténine sont finalement ancrées aux molécules du cytosquelette afin d'assurer la stabilité de la jonction (Dejana, 1996). Ainsi, un des domaines structuraux de l' α -caténine est susceptible d'interagir avec la vinculine, une protéine de pontage entre la membrane cytoplasmique et l'actine, ce qui permettrait une liaison entre la jonction adhérente et le cytosquelette (Tsukita et al., 1992), (Figure 3). La cinétique de formation des jonctions a été étudiée dans un tapis de cellules endothéliales en culture. Le complexe VE-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine se forme rapidement lors de la mise en place de ces jonctions au moment où les cellules atteignent la confluence alors que la plakoglobine ne vient s'associer à ce complexe que beaucoup plus tardivement. Inversement lors d'une blessure dans le tapis cellulaire, la plakoglobine se dissocie la première du complexe dans les cellules en migration dépourvues de jonction intercellulaire (Lampugnani et al., 1995).

4) Les autres molécules intervenant dans les jonctions cellulaires

La jonction de type desmosome est une jonction épithéliale faisant intervenir des protéines transmembranaires de la famille des cadhérines et les protéines cellulaires : la plakoglobine et la desmoplakine. Elle n'existe pas dans les cellules endothéliales alors que certains éléments de ce type de jonction s'y expriment. La distribution de la desmoplakine se superpose en certains points avec celle de la plakoglobine et de la VE-cadhérine dans les cellules endothéliales humaines (Valiron et al., 1996) où elles formeraient un nouveau type de jonction parfois appelé *syndesmos*.

D'autres éléments peuvent être localisés au niveau des jonctions cellulaires. La molécule d'adhérence PECAM (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*) a été détectée au niveau de

jonctions cellulaires mais sa localisation diffère des cadhérines (Ayalon et al., 1994). Sa contribution aux jonctions entre cellules endothéliales est certaine mais n'assure cependant pas leur maintenance. En effet, des anticorps anti-PECAM n'ont aucun effet sur des cellules endothéliales dont les jonctions sont déjà établies (Dejana et al., 1995). Des intégrines, principalement $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$, par ailleurs impliquées dans les relations entre la cellule et la matrice extra-cellulaire, sont également présentes au niveau des jonctions entre cellules endothéliales.

B. Le développement des vaisseaux sanguins

Deux processus permettent la mise en place de vaisseaux sanguins dans un organisme, la vasculogénèse et l'angiogénèse. La vasculogénèse correspond à la différenciation *in situ* des angioblastes, cellules précurseurs des cellules endothéliales et à leur organisation en vaisseau sanguin. C'est ce mécanisme qui est à l'origine de la formation du tout premier réseau vasculaire appelé plexus vasculaire primaire. L'angiogénèse est le développement par bourgeonnement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant.

1. La vasculogénèse

Le processus de vasculogénèse a été particulièrement bien étudié au cours du développement embryonnaire du poulet. D'abord parce que l'accès aux embryons de poulet est relativement aisé et que des marqueurs aviaires des cellules endothéliales sont disponibles mais aussi grâce à l'astucieux modèle des chimères caille-poulet qui a particulièrement contribué à étudier le processus (LeDouarin, 1973).

a) Différenciation des angioblastes à partir du mésoderme

Après la ponte, l'embryon de poulet n'est constitué que de deux feuillets : l'ectophylle et l'entophylle. Un troisième feuillet va se mettre en place, au cours de la gastrulation, par invagination, au niveau de la ligne primitive, de plusieurs territoires (Figure 4). Ce nouveau feuillet appelé mésoblaste va donner naissance à l'ensemble du mésoderme (mésoderme axial, mésoderme somitique, mésoderme de la pièce intermédiaire et mésoderme des lames latérales).

Gastrulation chez l'embryon de Poulet: mise en place du mésoblaste

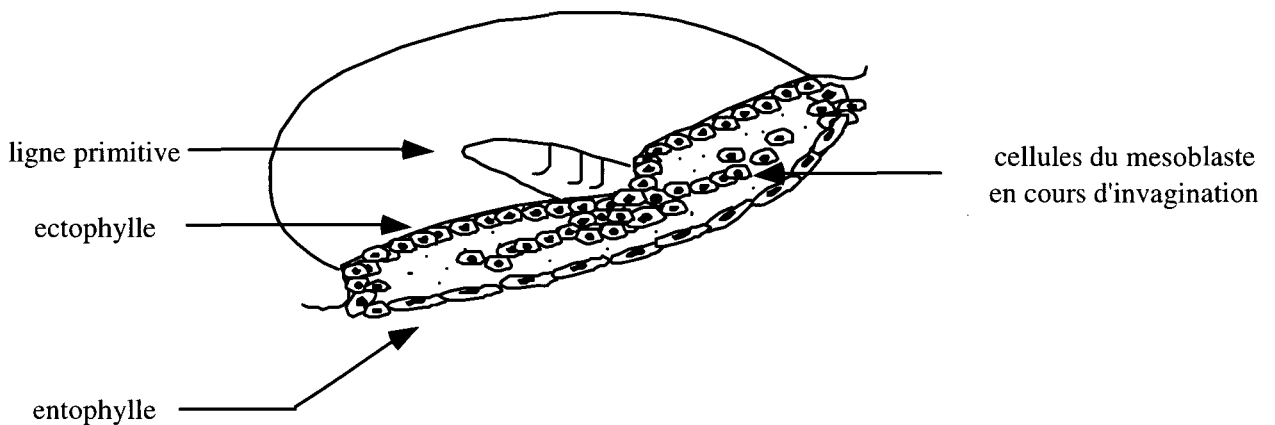


Figure 4: La mise en place du mésoblaste

Par invagination au niveau de la ligne primitive, le feuillet mésoblastique se met en place entre les deux feuillets embryonnaires déjà existants, l'ectophylle et l'entophylle. De ce mésoblaste vont dériver les premières cellules du système vasculaire.

Parmi les premières cellules migrant entre l'ectophylle et l'entophylle, certaines vont quitter la zone embryonnaire pour rejoindre la zone extra-embryonnaire, notamment une des annexes embryonnaires, la vésicule vitelline. Le mésoderme des lames latérales va se creuser et se diviser alors en deux structures séparées par la cavité coelomique : la somatopleure située à proximité de l'ectoderme et la splanchnopleure localisée à proximité de l'endoderme. A partir de la splanchnopleure extra-embryonnaire vont se former les îlots sanguins où apparaissent les premières cellules sanguines et les premiers précurseurs des cellules endothéliales, les angioblastes (Figure 5). La différenciation des angioblastes n'est pas dépendante de la gastrulation puisque l'inhibition mécanique de cette étape par mise en culture du blastoderme embryonnaire n'empêche pas la formation du mésoderme et la différenciation de ces précurseurs (Zagris, 1980). Par contre, la différenciation des angioblastes dépend de l'influence du feuillet voisin, l'endoderme, puisque celle-ci ne se produit qu'au niveau de la splanchnopleure et que l'élimination du feuillet endodermique au niveau de la vésicule vitelline inhibe la différenciation des angioblastes (revue Risau and Flamme, 1995). L'existence d'hémangioblastes, précurseurs communs pour les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques a été évoquée. In vitro, des clones de cellules mésodermiques peuvent se différencier en cellules endothéliales ou en cellules hématopoïétiques selon les conditions de culture (Eichmann et al., 1997). Cependant peu d'éléments expérimentaux apportent la preuve de l'existence de ces précurseurs communs.

Au niveau embryonnaire, l'ébauche du système cardio-vasculaire se différencie peu après l'apparition des îlots sanguins dans la zone extra-embryonnaire, et cette différenciation se produit

également à partir du mésoderme des lames latérales. Très rapidement, les réseaux vasculaires embryonnaire et extra-embryonnaire vont se connecter.

b) Formation du plexus vasculaire primaire

Dans l'aire vasculaire de la zone extra-embryonnaire, les îlots sanguins sont des amas cellulaires constitués en périphérie des angioblastes et au centre de cellules précurseurs de cellules hématopoïétiques (Pardanaud et al., 1989). Au niveau de l'embryon, la mise en place est différente, les angioblastes se différencient seuls ; les précurseurs des cellules hématopoïétiques ne se différencient que sur la paroi ventrale de l'aorte (Cormier et al., 1986; Olah et al., 1988). Les angioblastes sont alors capables soit de migrer pour s'associer à d'autres angioblastes soit de former directement sur place un capillaire (Figure 5). Dans l'embryon, ces vaisseaux sanguins seront ultérieurement colonisés par les cellules hématopoïétiques issues de l'aorte ou de la zone extra-embryonnaire (Dieterlen-Lièvre, 1975; Dieterlen-Lièvre et al., 1988; Müller et al., 1994).

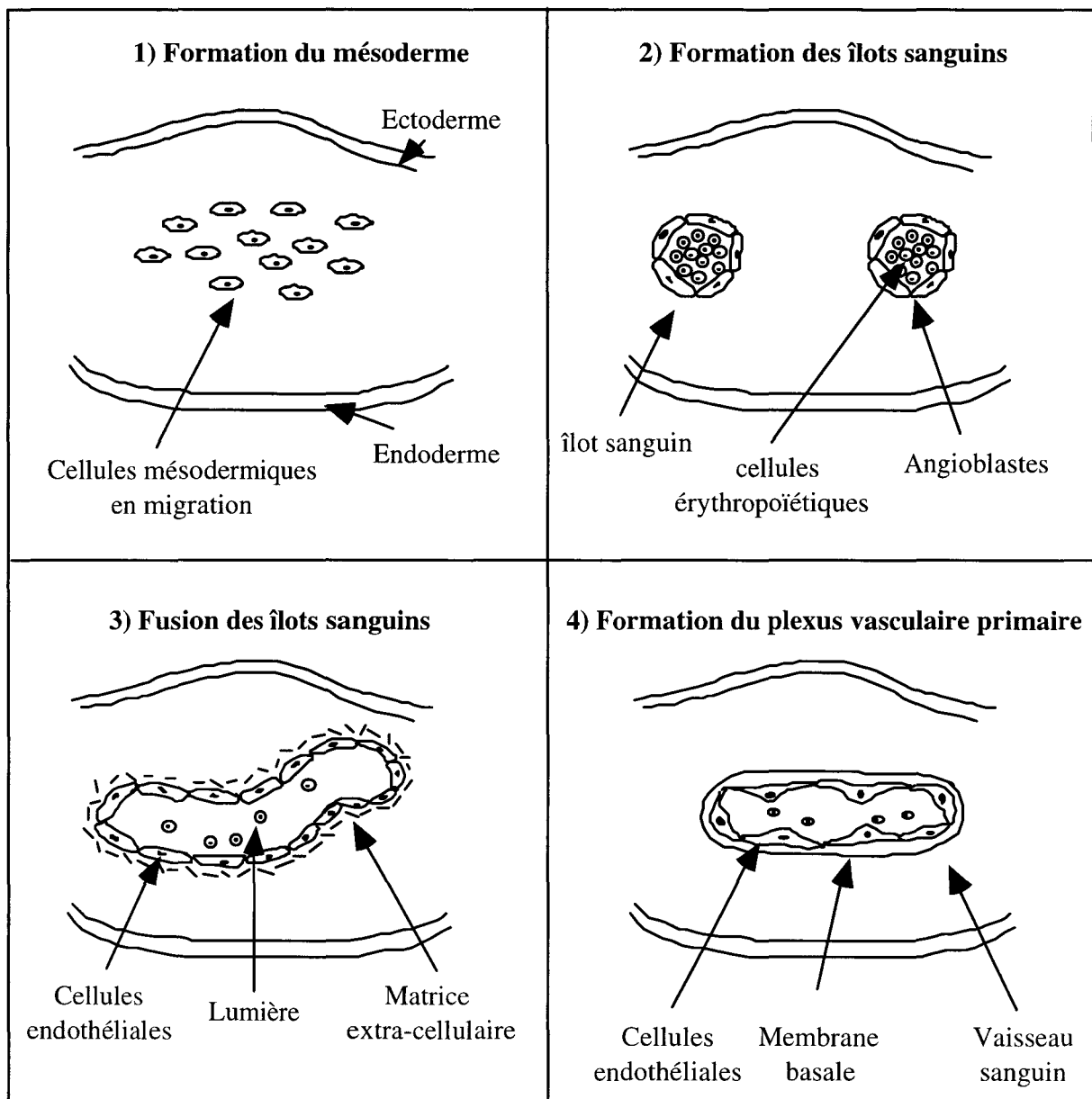


Figure 5: Les différentes phases de la vasculogénèse

La formation du mésoderme, la différenciation des îlots sanguins, la fusion de ces îlots entre eux et enfin, l'obtention d'un vaisseau fonctionnel (cellules endothéliales différenciées, membrane basale synthétisée) sont les phases du processus de vasculogénèse.

Au sein des annexes embryonnaires, l'amnios constitué d'ectoderme et de mésoderme n'est pas vascularisé alors que la vésicule vitelline et l'allantoïde formés d'endoderme et de mésoderme sont abondamment vascularisés (Pardanaud and Dieterlen-Lievre, 1993). Ces observations ainsi que des expériences de greffe suggèrent que les organes et tissus dépourvus de structure issue de l'endoderme ne peuvent pas être vascularisés par le processus de vasculogénèse mais par le processus d'angiogénèse. Ainsi, le processus de vasculogénèse s'opérerait au niveau du poumon, du pancréas, de la rate alors que le processus d'angiogénèse serait responsable de l'irrigation du rein et du cerveau (revue Beck and D'Amore, 1997).

c) La régulation de la vasculogénèse

On distingue trois étapes dans le processus de vasculogénèse : 1) l'induction du mésoderme d'où sont issus les précurseurs des cellules endothéliales ; 2) la différenciation des angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales ; 3) la formation des premiers vaisseaux organisés (formation de la lumière, synthèse de la membrane basale, etc.).

1) *L'induction du mésoderme et la différenciation des précurseurs*

L'induction de l'invagination et de la différenciation du mésoblaste met en jeu des échanges de signaux entre l'endoderme et l'ectoderme. Deux types d'informations sont supposés être échangés : l'une concerne la différenciation du mésoderme dorsal à l'origine de la notochorde et l'autre concerne la différenciation du mésoderme ventral et latéral qui donnera entre autres les muscles, les reins, et les vaisseaux sanguins (Woodland, 1989). Différents facteurs de croissance sont connus pour induire *in vitro* la différenciation d'explants ectodermiques de Xénope en plusieurs types cellulaires mésodermiques : des membres de la famille des FGFs (*Fibroblast Growth Factor*), du TGF β (*Transforming Growth Factor β*) (Kimelman and Kirschner, 1987) et notamment les activines (Smith et al., 1990; Van den Eijnden-Van Raaj et al., 1990). Les patrons d'expression du bFGF (FGF basique) et de son récepteur (Kimelman et al., 1988; Slack and Isaacs, 1989) ainsi que ceux du TGF β ou des activines (Thomsen et al., 1990; Weeks and Melton, 1987) sont en faveur de l'implication de ces facteurs dans l'induction du mésoblaste. De plus, l'expression, dans l'embryon de Xénope, d'un mutant dominant négatif du récepteur au FGF (XFR) dont le domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase a été tronqué, provoque l'absence de somite, le développement d'un cœur de petite taille et l'absence ou la mauvaise localisation des vaisseaux sanguins (Amaya et al., 1991).

L'un des récepteurs du VPF/VEGF (*vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor*), VEGFR-2 (également connu sous le nom de flk-1 chez la souris ou KDR chez l'homme) s'exprime dans des cellules du mésoderme destinées à se différencier en angioblastes (Millauer et al., 1993). Un peu plus tardivement, le VEGF lui-même est produit au niveau de l'endoderme lors du développement embryonnaire (Breier et al., 1995; Flamme et al., 1995). Ces données suggèrent que la différenciation des angioblastes à partir des cellules du feuillet mésodermique qui expriment le VEGFR-2 dépend du VEGF produit par les cellules endodermiques. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de recombinaison homologue des gènes codant le VEGF ou ses récepteurs. En effet, l'inactivation du gène codant flk-1 conduit à une mort intra-utérine des embryons au stade 8.5-9.5 jours *post-coitum* ; dans ces embryons les îlots sanguins et les structures vasculaires sont absentes (Shalaby et al., 1995). De même, les

animaux hétérozygotes déficients en VEGF meurent au stade 11-12 jours de développement embryonnaire et présentent de nombreuses anomalies dans leur système vasculaire (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). En revanche, l'inactivation du gène codant Flt-1, un autre récepteur pour le VEGF, n'empêche pas la différenciation des cellules endothéliales dans les zones embryonnaires et extra-embryonnaires mais perturbe l'organisation des vaisseaux entraînant la mort *in utero* des embryons (Fong et al., 1995). Ces résultats démontrent ainsi les fonctions distinctes des récepteurs au VEGF dans le processus de vasculogénèse, Flk-1 participant d'avantage à la différenciation des cellules endothéliales alors que Flt-1 est impliqué dans l'organisation des vaisseaux.

2) *Le premier réseau vasculaire*

Dans les îlots sanguins, les précurseurs des cellules endothéliales continuent à exprimer les récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2, Dumont et al., 1995; Millauer et al., 1993; Yamaguchi et al., 1993); ils expriment également des molécules spécifiques des cellules endothéliales comme la VE-cadhérine (Breier et al., 1996). Suite à la formation de ces îlots, les cellules endothéliales commencent leur différenciation et les premiers éléments de la matrice extra-cellulaire et de la membrane basale apparaissent (Risau and Flamme, 1995). Finalement, ces structures fusionnent entre elles pour aboutir à la formation du plexus vasculaire primaire où les vaisseaux sanguins différenciés auront acquis la structure de capillaires (revue Risau and Flamme, 1995). Bien que de nombreux facteurs exprimés au cours de ces différentes étapes soient identifiés (les récepteurs au VEGF, des molécules intervenant dans les jonctions intercellulaires, des facteurs de transcription ou des composants de la matrice extra-cellulaire), la régulation moléculaire de ces processus complexes restent encore peu connue.

2. L'angiogenèse

a) Angiogenèse embryonnaire ou chez l'adulte

1) *Chez l'embryon*

L'angiogenèse embryonnaire fait suite à la vasculogénèse qui avait permis la formation d'un réseau vasculaire primaire. Elle se produit non seulement dans la zone embryonnaire mais également dans la zone extra-embryonnaire (revue Risau, 1997). De nouveaux capillaires vont en effet se développer par bourgeonnement à partir des capillaires existants ou à partir des petites veines pour compléter le réseau déjà en place.

Certains organes débutent leur développement sans aucune vascularisation (par exemple le cerveau) et se retrouveront irrigués suite à l'angiogenèse embryonnaire. Cette irrigation sera fondamentale pour la poursuite du développement de ces organes encore rudimentaires.

2) Chez l'adulte : situations normales ou pathologiques :

i) L'angiogenèse adulte normale

L'angiogenèse adulte normale correspond au développement contrôlé de nouveaux vaisseaux sanguins dans le but d'assurer des fonctions physiologiques précises. Ainsi, lors du cycle oestrien de la femme, la muqueuse utérine s'épaissit et le réseau de capillaires sanguins s'accroît afin d'assurer, dans le cas d'une fécondation, la nidation de l'oeuf et le développement correct de l'embryon. Cette angiogenèse utérine est sous influence hormonale. De même, au cours de ce cycle oestrien, après l'expulsion de l'ovocyte, le corps jaune se développe au niveau de l'ovaire et une angiogenèse s'y produit également afin d'y assurer un flux sanguin suffisant pour véhiculer au mieux les hormones sécrétées par cette structure liée au cycle de reproduction des mammifères. Au cours de la cicatrisation de blessures, des nouveaux capillaires se forment dans le tissu de granulation mais sous un contrôle à nouveau très précis. En effet, lorsque la réparation de la zone endommagée sera achevée, le réseau vasculaire voisin retrouvera la quiétude caractéristique de l'organisme adulte.

A cette angiogenèse dite normale s'oppose l'angiogenèse pathologique liée à des dysfonctionnements de l'organisme adulte.

ii) L'angiogenèse adulte pathologique

De nombreuses affections entraînent l'activation de l'angiogenèse chez l'adulte. Ainsi, la croissance d'une tumeur est dépendante de l'angiogenèse qui va s'y dérouler. Les nouveaux vaisseaux sanguins qui l'irrigueront vont assurer les apports et les échanges qui lui sont indispensables et ceci au détriment de l'organisme. L'athérosclérose provoque également le déclenchement d'une angiogenèse car l'asphyxie des zones mal irriguées se traduit par le développement de nouveaux capillaires formant un *vasa vasorum*. Cette réaction de l'organisme n'est malheureusement pas efficace puisque les capillaires formés sont fragiles et sont de ce fait le lieu d'hémorragies qui peuvent être à l'origine d'une attaque cardiaque (revue Fan et al., 1995). Le diabète peut entraîner une rétinopathie dite diabétique qui se caractérise par une vascularisation de la rétine et du corps vitré (pouvant entraîner une importante diminution de l'acuité visuelle) suite aux thromboses veineuses. Outre ces situations que nous venons de détailler, le psoriasis ou l'arthrite déclenchent également une angiogenèse. Par la suite, nous

présenterons principalement les données concernant l'angiogenèse tumorale qui fait actuellement l'objet de nombreux travaux. En effet, l'inhibition de l'angiogenèse tumorale est un des traitements thérapeutiques envisagé dans le but de lutter contre le développement des tumeurs.

b) Chronologie des événements morphologiques de l'angiogenèse

De récents travaux commencent à mettre en évidence l'existence de mécanismes différents pour la régulation de l'angiogenèse « normale » ou la régulation de l'angiogenèse pathologique. Cependant, un dogme est encore admis actuellement concernant les étapes mises en jeu lors du processus d'angiogenèse. Il est en effet proposé que le déroulement de l'angiogenèse passe par le bourgeonnement d'un capillaire ou d'une veine différencié, que ces nouveaux vaisseaux subissent une maturation et qu'ils sont également soumis à un « élagage » avant de former des structures définitives (Folkman, 1984; Risau, 1997).

1) Bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir du réseau primaire de capillaires

Le déroulement du bourgeonnement d'un nouveau vaisseau a été particulièrement bien décrit par l'équipe de Judah Folkman qui a utilisé comme modèle l'implantation d'un fragment de tumeur dans la cornée de lapin (Ausprunk and Folkman, 1977). Le premier jour suivant l'implantation, l'analyse en microscopie électronique a montré que les cellules endothéliales d'un vaisseau proche de l'implant sont passées d'une morphologie fine et aplatie à une morphologie beaucoup plus ronde. De plus, au niveau du vaisseau parental, seules les cellules endothéliales situées du côté de l'implant présentent ces variations morphologiques. Entre le premier et le deuxième jour après l'implantation, la membrane basale du vaisseau préexistant se dégrade, entraînant la migration des cellules endothéliales à travers cette membrane détruite et dans la matrice péri-vasculaire. D'autres cellules endothéliales suivront le même parcours et toutes les cellules récupéreront leur capacité à proliférer. Au bout de quatre jours, le capillaire en bourgeonnement sera déjà bien structuré (Figure 6). Cependant, le sang ne circule pas encore dans ces « jeunes » vaisseaux et seuls quelques globules rouges issus du vaisseau parental peuvent y être retrouvés. Il faut attendre la fusion entre différents bourgeonnements de capillaire en des structures de type boucle pour que la circulation sanguine se mette en place. Le bourgeonnement de ces nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire déjà existant implique donc trois étapes 1) la dégradation de la membrane basale au niveau du vaisseau parental, 2) la migration et la prolifération des cellules endothéliales dans la matrice extracellulaire environnante, 3) la réorganisation en une structure tubulaire de ces cellules

accompagnée de la formation d'une lumière et la synthèse d'une nouvelle membrane basale pour former un nouveau vaisseau fonctionnel (Figure 6).

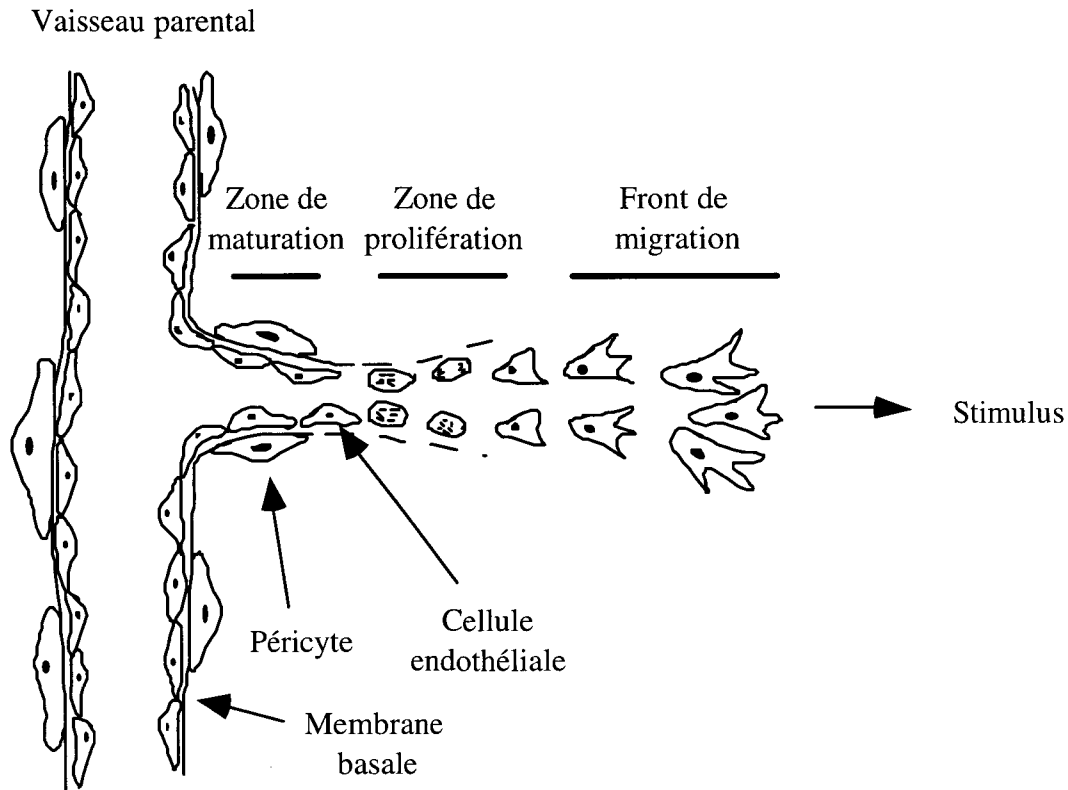


Figure 6: Le bourgeonnement d'un nouveau vaisseau sanguin

Suite à la dégradation de la membrane basale du vaisseau parental, les cellules endothéliales migrent dans l'espace périvasculaire avant de proliférer pour permettre la formation d'un nouveau vaisseau sanguin après maturation.

2) Remodelage de la structure vasculaire développée

Parmi les nombreux nouveaux vaisseaux formés, certains vont rapidement régresser alors que d'autres vont poursuivre leur développement ; c'est la phase d'élagage décrite notamment au cours du développement embryonnaire. Par ailleurs, le diamètre des vaisseaux va évoluer ainsi que l'épaisseur de leur paroi pour s'adapter au besoin des tissus environnants (revue Beck and D'Amore, 1997).

3) La maturation des vaisseaux

Des modifications de la membrane basale, la différenciation des péricytes ou des cellules musculaires lisses, et l'acquisition d'une certaine élasticité pour le vaisseau (notamment dans le cas des artères) représentent les phases de maturation de l'angiogenèse. Cette maturation semble être étroitement liée à la mise en place du flux sanguin dans ces nouveaux vaisseaux (Resnick and Gimbrone, 1995).

c) Les acteurs moléculaires impliqués dans le développement des vaisseaux

Le bourgeonnement d'un nouveau vaisseau sanguin débute avec la destruction de la cohésion du vaisseau parental pour permettre les premiers changements morphologiques des cellules endothéliales à l'origine du futur vaisseau et s'achève par le rétablissement d'une structure organisée dont les propriétés de perméabilité et d'élasticité doivent être adaptées aux fonctions requises. Les étapes successives du processus angiogénique doivent alors faire appel à une signalisation complexe entre les cellules endothéliales et leur environnement. Ces différents signaux comprennent des facteurs qui régulent l'angiogenèse (les facteurs angiogéniques ou anti-angiogéniques) et des facteurs qui potentialisent le processus angiogénique (les éléments de la matrice extra-cellulaire, les récepteurs d'adhérence cellule/cellule ou cellule/matrice).

1) *La stimulation de l'angiogenèse*

Le bourgeonnement d'un capillaire à partir d'un vaisseau sanguin parental nécessite l'influence de facteurs puissants dont l'effet sera de stimuler des cellules quiescentes afin d'initier le processus angiogénique.

i) *Les facteurs angiogéniques et leurs récepteurs*

De nombreux facteurs angiogéniques ont déjà été identifiés dont des facteurs de croissance (le VEGF, les FGFs, l'EGF, le TGF α , le TGF β), d'autres protéines et peptides (l'angiogénine, l'angiotensine II), des lipides (les prostaglandines E1 et E2) et d'autres composés (Tableau 1). Certains de ces facteurs sont connus pour provoquer une angiogenèse dans des tests *in vivo* classiques comme le test de la membrane chorio-allantoïdienne du poulet (Ausprunk et al., 1975), le test de la joue de hamster (Greenblatt and Shubik, 1968), le test d'implant dans la cornée de lapin (Gimbrone et al., 1974), ou les implants d'éponge en sous-cutané chez les rongeurs (Thompson et al., 1988). Parallèlement, leur implication dans les étapes de l'angiogenèse (stimulation des cellules endothéliales, migration ou prolifération des cellules, morphogenèse capillaire) a été étudiée *in vitro* (Tableau 1).

Facteur angiogénique	Tests in vivo	Prolifération endothéliales	Migration	Références
Angiopoïétine 1*		Pas d'effet		(Suri et al., 1996)
E-selectine soluble	cornée	Pas d'effet	+	(Koch et al., 1995; Labow et al., 1994)
FGF-1(aFGF)	CAM, cornée, SC/P	+	+	(Lobb et al., 1985; Terranova et al., 1985; Thomas et al., 1985)
FGF-2(bFGF)	CAM, cornée, SC/P	+	+	(Gospodarowicz et al., 1976; Gospodarowicz et al., 1977; Hayek et al., 1987; Shing et al., 1984; Tsuboi et al., 1990)
FGF-3	CAM, SC/P			(Costa et al., 1994)
FGF-4	CAM, cornée, SC/P	+		(Delli-Bovi et al., 1987; Yoshida et al., 1994)
G-CSF/GM-CSF	cornée	+	+	(Bussolino et al., 1991)
HGF/SF	cornée, SC/P	+	+	(Grant et al., 1993; Rosen et al., 1990; Rubin et al., 1991)
IGF-1	cornée	Pas d'effet	+	(Grant et al., 1993; Nakao-Hayashi et al., 1992; Nicosia et al., 1994)
IL-8	cornée, SC/P	+	+	(Hu et al., 1993; Koch et al., 1992; Smith et al., 1994)
PD-ECGF/TP	CAM, SC/P	Pas d'effet**	+	(Ishikawa et al., 1989; Moghaddam and Bicknell, 1992; Moghaddam et al., 1995)
PDGF	CAM, cornée	+	+	(Koyama et al., 1994; Lindahl et al., 1997; Risau et al., 1992)
PIGF	cornée	+	+	(Cao et al., 1996; DiSalvo et al., 1995; Ziche et al., 1997)
TGF- α /EGF	cornée, joue, SC/P	+		(Azuma et al., 1994; Gospodarowicz et al., 1979; Mahadevan et al., 1989; Schreiber et al., 1986)
TGF- β 1	CAM, cornée, SC/P	Inhibe	+	(Dickson et al., 1995; Roberts et al., 1986; Yang and Moses, 1990)
TNF α	CAM, cornée	Inhibe	+	(Fräter-Schröder et al., 1987)
VCAM-1 soluble	cornée	Pas d'effet	+	(Koch et al., 1995)
VEGF	CAM, cornée	+	+	(Connolly et al., 1989; Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989; Keck et al., 1989; Koch et al., 1994; Leung et al., 1989; Plouët et al., 1989)
Pleïotrophine	cornée	+		(Choudhuri et al., 1997; Laaroubi et al., 1994)
Angiogénine	cornée, CAM	Pas d'effet		(Fett et al., 1985; Hu et al., 1997)
Angiotensine II	CAM, cornée, SC/P	+/-		(Andrade et al., 1996; Fernandez et al., 1985; Le Noble et al., 1991; Porta et al., 1992)
LTC4	CAM		+	(Kanayasu et al., 1989)
PGE1 et PGE2	cornée, SC/P	+		(Kanayasu et al., 1989)
Proliférine	cornée		+	(Jackson et al., 1994)
Tryptase	-	+		(Blair et al., 1997)

Tableau 1: Les propriétés des facteurs angiogéniques

Les effets *in vivo* et *in vitro* des facteurs angiogéniques sont résumés dans ce tableau.

Cornée, test d'angiogenèse dans la cornée (lapin, rat ou souris) ; SC/P, regroupe tous les tests *in vivo* faisant intervenir une injection soit sous-cutanée, soit intrapéritonéale ; CAM, test sur la membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet ; Joue, test dans la joue de hamster. Les effets observés sur la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire ont été groupés sous le terme 'prolifération'. **L'effet

apparent du PD-ECGF sur la synthèse d'ADN (Ishikawa et al., 1989) est dû à son activité thymidine-phosphorylase (Moghaddam and Bicknell, 1992). EGF, *epidermal growth factor* ; FGF, *fibroblast growth factor* ; G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor* ; HGF/SF, *hepatocyte growthfactor/scatter factor* ; IGF, *insulin-like growth factor* ; IL, *interleukin* ; PD-ECGF/TP, *platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase* ; PDGF, *platelet derived growth factor* ; TGF, *transforming growth factor* ; TNF, *Tumor necrosis factor* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; LTC4, leucotriène C4 ; PGE, prostaglandine E. *L'angiopoïétine a été introduite dans ce tableau du fait du classement par les inventeurs dans la catégorie des facteurs angiogéniques, cependant cette propriété n'est pas actuellement démontrée.(Ce tableau est une version modifiée d'après Bouck et al., 1996)

Au cours du développement tumoral, plusieurs voies permettent la libération de ces facteurs angiogéniques et l'induction de l'angiogenèse. Ces facteurs peuvent être issus soit de la tumeur directement, soit produits par les macrophages, les mastocytes ou les lymphocytes préalablement recrutés par des facteurs diffusibles issus des cellules tumorales, soit libérés de la matrice extra-cellulaire où ils sont piégés après dégradation de cette dernière (Folkman and Shing, 1992), (Figure 7).

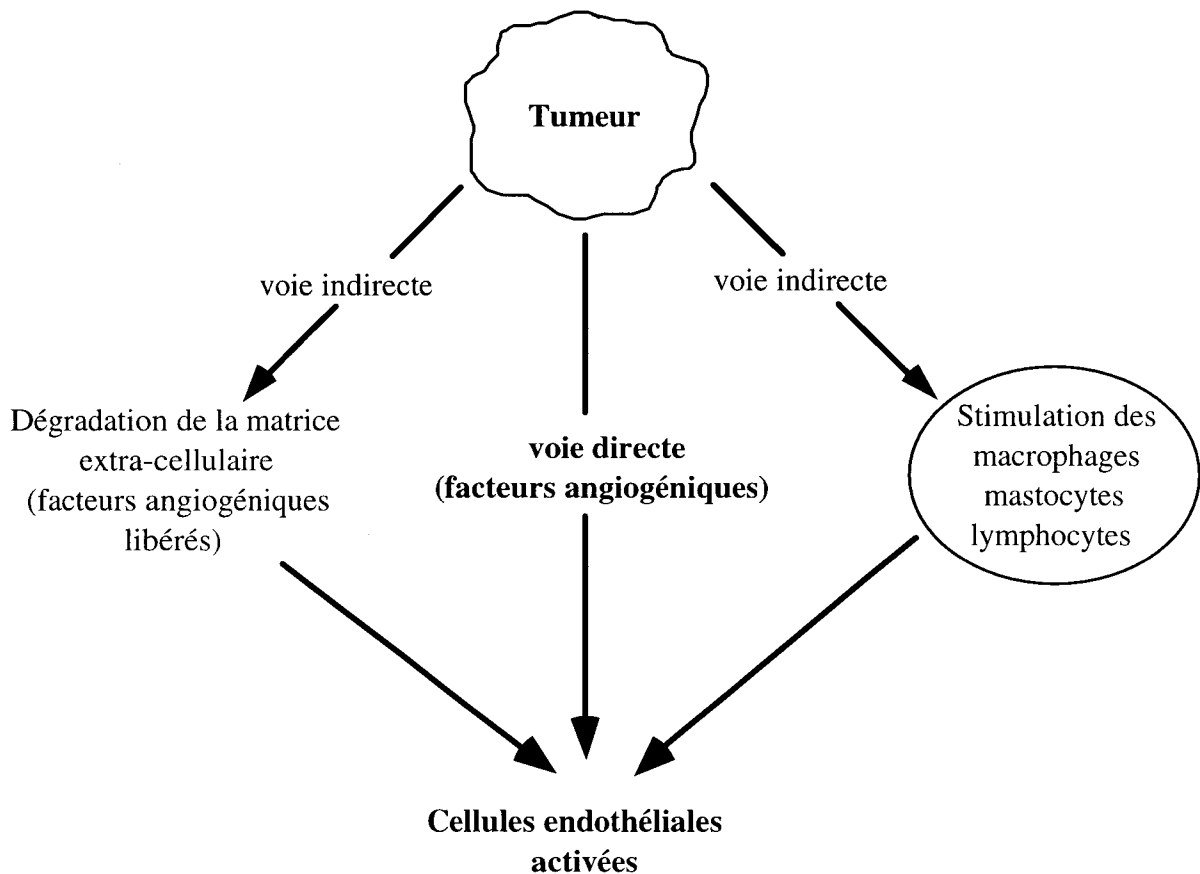


Figure 7: Les voies de libération des facteurs angiogéniques

La voie directe de libération des facteurs angiogéniques correspond à une synthèse de ces facteurs directement par les cellules cancéreuses. Les voies indirectes passent soit par la stimulation des macrophages, des mastocytes ou des lymphocytes qui libèrent alors les facteurs angiogéniques, soit par la dégradation de la matrice extra-cellulaire où des facteurs avaient été stockés.

Nous nous intéresserons dans ce chapitre aux propriétés d'un seul facteur angiogénique dont l'implication dans le processus angiogénique semble être essentielle : le VEGF/VPF (*vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor*). Les propriétés d'autres facteurs angiogéniques sont résumées dans le Tableau 1.

- **Les VEGFs et leurs récepteurs**

Le VEGF est un dimère de glycoprotéines dont le poids moléculaire total est de 46 kDa (Ferrara and Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989). Plusieurs isoformes, provenant d'épissages alternatifs, sont actuellement connues : le VEGF₂₀₆, le VEGF₁₈₉, le VEGF₁₆₅ et le VEGF₁₂₁ (Ferrara et al., 1992; Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991). D'autre part, deux facteurs proches du VEGF ont également été identifiés le VEGF-B (Olofsson et al., 1996) et le VEGF-C (Joukov et al., 1996). Parallèlement, jusqu'à présent, trois récepteurs au VEGF ont été découverts : le VEGFR-1 (ou Flt-1), le VEGFR-2 (Flk-1/KDR) et le VEGFR-3 (Flt-4). Ce sont des récepteurs transmembranaires comprenant une partie extra-cellulaire avec sept domaines de type immunoglobuline et une partie intracellulaire à fonction de tyrosine kinase (Mustonen and Alitalo, 1995). De plus un fragment naturel du récepteur Flt-1, nommé sFlt-1, a été identifié dans le milieu conditionné de cellules HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*) ; il peut former *in vitro* un complexe avec le domaine extra-cellulaire du récepteur KDR fixant le VEGF (Kendall et al., 1996).

- **Les propriétés des VEGF**

Dans le test de la membrane chorio-allantoïdienne du poulet, le VEGF s'est révélé être un facteur angiogénique (Leung et al., 1989; Plouët et al., 1989). *In vitro*, le VEGF induit la prolifération des cellules endothéliales (Ferrara and Henzel, 1989; Leung et al., 1989), favorise la migration des cellules (Koch et al., 1994) et induit l'expression du récepteur de l'activateur du plasminogène (Mandriota et al., 1995) ainsi que l'activation du plasminogène et de son inhibiteur dans les cellules endothéliales (Pepper et al., 1991). *In vivo*, l'inactivation du VEGF, par l'utilisation d'anticorps dans des greffes de tumeurs humaines, induit une régression et des changements de perméabilité des vaisseaux (Kim et al., 1993). Parallèlement, un mutant dominant négatif du récepteur Flk-1 du VEGF inhibe la croissance des tumeurs dans des souris immunodéficientes (Millauer et al., 1994). Le VEGF-B pourrait être également impliqué dans le processus angiogénique ; il est exprimé majoritairement dans les tissus musculaires et induit la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Olofsson et al., 1996). En revanche, le VEGF-C aurait une fonction plutôt différente puisque sa surexpression perturbe le réseau lymphatique (Jeltsch et al., 1997).

- **Les patrons d'expression du VEGF et de ses récepteurs**

La description de l'expression du VEGF et de ses récepteurs vient renforcer l'implication de ce facteur dans l'angiogenèse. Durant le développement embryonnaire, les ARNs codant les différentes isoformes du VEGF ont été détectés au niveau du cerveau, notamment dans le feuillet ventriculaire où cette expression diminue chez l'adulte, au niveau de l'épithélium glomérulaire du rein où cette expression persiste chez l'adulte à proximité des capillaires fenestrés, au niveau du poumon, des tubes séminifères du testicule, du placenta (Breier et al., 1992). Il existe donc au cours de l'embryogenèse, une corrélation spatio-temporelle entre l'expression du VEGF et le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Cette proximité spatiale entre l'expression du VEGF et les zones d'angiogenèse se retrouve dans diverses situations pathologiques. Dans des gliomes ou des carcinomes du sein et même dans les angiosarcomes, l'expression du VEGF est associée aux cellules cancéreuses (Hashimoto et al., 1995; Plate et al., 1992; Yoshiji et al., 1996). Dans les ulcères gastriques, elle est associée à des cellules à morphologie allongée, probablement des fibroblastes (Takahashi et al., 1997). Enfin, le VEGF a été détecté dans le fluide oculaire de patients atteints de rétinopathie diabétique (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1994; Miller et al., 1994).

Parallèlement, les récepteurs du VEGF sont exprimés dans les cellules endothéliales au moment même où l'angiogenèse est initiée. Ainsi, au cours du développement embryonnaire de la souris, le récepteur Flk-1 est détecté dans les cellules endothéliales des vaisseaux en formation que ce soit dans la zone extra-embryonnaire ou dans l'embryon (Millauer et al., 1993). De même, le récepteur Flt-1 est exprimé dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins de gliomes (Plate et al., 1992). La plupart des travaux actuels décrivent l'expression des récepteurs des VEGFs comme étant spécifique des cellules endothéliales. Il faut cependant noter que quelques travaux démontrent que l'expression de ces récepteurs n'est pas restreinte aux cellules endothéliales, et très récemment Flt-1 et KDR ont été détectés dans les cellules musculaires lisses de l'utérus (Brown et al., 1997). Si le VEGF et ses récepteurs sont sans aucun doute des acteurs fondamentaux du processus angiogénique, leurs fonctions pourraient ne pas se limiter à ce processus.

- **Le VEGF et l'hypoxie**

L'association entre l'hypoxie et une néovascularisation est particulièrement évidente dans les affections oculaires où la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est précédée par l'apparition de zones ischémiques. De plus, l'exposition de jeunes rats à des taux élevés d'oxygène (80%) et leur retour dans un environnement gazeux normal provoque l'apparition d'une

néovascularisation au niveau de l'oeil (Reynaud and Dorey, 1994). Une augmentation de production du VEGF suffit à cette néovascularisation comme l'indiquent des cultures *in vitro* d'épithélium pigmentaire de rétine humaine. Soumises à hypoxie, ces cellules en culture synthétisent du VEGF (notamment les isoformes 121 et 165) alors que d'autres facteurs angiogéniques ne sont pas surexprimés (Shima et al., 1995). D'autre part, à proximité de zones tumorales nécrotiques, les ARNm codant le VEGF ont été détectés ainsi que dans des lignées de cellules cancéreuses privées d'oxygène (Shweiki et al., 1992).

- **Le VEGF : un facteur de survie des vaisseaux sanguins**

L'existence de facteurs de survie pour les vaisseaux sanguins a été soupçonnée suite à des observations médicales. Des enfants prématurés et exposés à des taux d'oxygène élevés développent une rétinopathie au cours de laquelle les vaisseaux sanguins de la rétine dégénèrent. La régression de ces vaisseaux sanguins serait la conséquence d'une diminution d'expression d'un facteur essentiel pour leur survie. Inversement au modèle d'hypoxie, les capillaires de la rétine de rats nouveaux nés, soumis à des taux élevés d'oxygène, régressent suite à une diminution d'expression du VEGF dans les cellules gliales voisines. L'apoptose des cellules endothéliales est responsable de ces régressions capillaires. Des injections intra-oculaires de VEGF, aux animaux exposés à l'hyperoxie évitent l'apoptose des cellules endothéliales et empêchent ainsi la régression des vaisseaux sanguins de la rétine (Alon et al., 1995). Le VEGF serait donc responsable de la survie des vaisseaux sanguins.

- **Le VEGF et la perméabilité des vaisseaux**

Outre sa fonction dans la stimulation, la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales au cours du processus angiogénique, le VEGF a également la propriété d'augmenter la perméabilité des vaisseaux sanguins aux macromolécules circulantes (Keck et al., 1989; Senger et al., 1983). Cette perméabilité des vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur a été directement démontrée après injection de macromolécules dans la circulation (Dvorak et al., 1984; Dvorak et al., 1988; Underwood and Carr, 1972) mais son rôle dans le processus angiogénique n'est que supposé. Des protéines plasmatiques telles que le fibrinogène, des facteurs de coagulation, le plasminogène diffusent effectivement, du fait de la perméabilité vasculaire, au sein de la tumeur. A partir de ces macromolécules, une coagulation s'opérerait pour former un réseau de fibrine. Ce réseau constituerait une matrice extra-cellulaire provisoire qui favoriserait le développement de nouveaux vaisseaux sanguins et la formation du stroma tumoral (Dvorak et al., 1995). Même si de nombreuses observations sont en accord avec cette

hypothèse, l'importance de la perméabilité vasculaire au cours du processus angiogénique n'a pas été réellement démontrée.

ii) Les facteurs anti-angiogéniques

Parallèlement à la découverte de facteurs induisant l'angiogenèse, des inhibiteurs ont également été identifiés. Ces facteurs peuvent inhiber *in vitro* la prolifération ou la migration des cellules endothéliales ainsi que leur capacité à former des pseudo-capillaires. *In vivo*, certains d'entre eux inhibent le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. Les propriétés de ces facteurs sont résumées dans le Tableau 2 qui regroupe non seulement les inhibiteurs « biologiques » qui s'expriment naturellement dans certains tissus mais également des inhibiteurs non présents naturellement dans l'organisme comme la fumagilline qui a été découverte par hasard par la contamination de culture de cellules endothéliales par un champignon ainsi que des produits synthétiques, par exemple, AGM1470. Il faut souligner l'existence parmi les facteurs anti-angiogéniques de produits de clivage de molécules déjà existantes dans les tissus et qui n'ont pas d'activité anti-angiogénique sous leur forme native (l'angiostatine, l'endostatine correspondant respectivement à un clivage du plasminogène et du collagène XVIII, des fragments de la prolactine, de la fibronectine). Les conditions de clivage de ces molécules *in vivo* seront intéressantes à connaître et pourraient déboucher sur de nouvelles stratégies développées dans le but de contrôler le processus angiogénique.

Facteurs anti-angiogéniques	inhibition in vivo	perturbe dans les cellules endothéliales	activité antitumorale	Références
2-methoxyoestradiol	CAM	prolifération, morphogénèse	oui	(Fotsis et al., 1994)
Acide rétinolique	CAM, cornée		oui	(Bollag and Holdener, 1992; Ingber and Folkman, 1988; Oikawa et al., 1989)
AGM-1470 Fumagilline	cornée	migration, prolifération	oui	(Ingber et al., 1990; Kusaka et al., 1991; Yamamoto et al., 1994; Yanase et al., 1993)
Angiostatine	CAM, cornée	prolifération	oui	(O'Reilly et al., 1994)
Cartilage derived inhibitor	CAM	prolifération, migration		(Moses et al., 1990)
Endostatine	CAM, SC/P	prolifération	oui	(O'Reilly et al., 1997)
Fibronectine (fragment de 29 kDa)		prolifération		(Hanahan and Folkman, 1996)
IFN- α	CAM, SC/P	migration, prolifération	oui	(Brouty-Boye and Zetter, 1980; Dvorak and Gresser, 1989; Ribatti et al., 1996; Sidky and Borden, 1987)
IFN- β	SC/P	migration, prolifération	oui	(Brouty-Boye and Zetter, 1980; Dvorak and Gresser, 1989; Sidky and Borden, 1987)
IFN- γ	cornée, SC/P	prolifération, morphogénèse	oui	(Norioka et al., 1994; Tsuruoka et al., 1988; Voest et al., 1995)
IL-1	cornée	prolifération, migration		(Cozzolino et al., 1990; Nakamura et al., 1986)
IL-12	CAM, cornée		oui	(Voest et al., 1995)
Inhibiteur placentaire de la ribonucléase	CAM, cornée		oui	(Polakowski et al., 1993; Shapiro and Vallee, 1987)
IP10	cornée, SC/P	migration	oui	(Angiolillo et al., 1996; Strieter et al., 1995)
PF4	CAM	prolifération, migration	oui	(Gengrinovitch et al., 1995; Maione et al., 1990; Sharpe et al., 1990)
Prolactine (fragment de 16 kDa)	CAM	prolifération, morphogénèse		(Clapp et al., 1993)
<i>Proliferin-related protein</i>	cornée	migration		(Jackson et al., 1994)
Protamine	CAM, cornée	prolifération	oui	(Neufeld and Gospodarowicz, 1987; Taylor and Folkman, 1982)
Thrombospondine/TSP-1	cornée, SC/P	migration, prolifération, morphogénèse	oui	(Bagavandoss and Wilks, 1990; Good et al., 1990; Rastinejad et al., 1989; Sheibani and Frazier, 1995; Taraboletti et al., 1990; Tolsma et al., 1993; Weinstat-Saslow et al., 1994)
TIMPs	CAM, cornée	migration, prolifération	oui	(Anand-Apte et al., 1997; Johnson et al., 1994; Khokha, 1994; Moses et al., 1990; Murphy et al., 1993; Takigawa et al., 1990)
Vitamine D3 et analogues	CAM		oui	(Eisman et al., 1987; Oikawa et al., 1990)

Tableau 2: Les facteurs anti-angiogéniques

Les propriétés des facteurs anti-angiogéniques sont résumées dans ce tableau.

CAM, test sur la membrane chorio-allantoïdienne du poulet ; cornée, test dans la cornée (lapin, souris, rat) ; SC/P, injection en sous cutané chez la souris. Les effets observés sur la synthèse d'ADN et la croissance cellulaire ont été groupés sous le terme 'prolifération'. IFN, interféron ; IL, interleukine ; IP10, *interferon gamma-inducible protein 10* ; PF4, *platelet factor 4* ; TIMP, *tissue inhibitor of metalloproteases*.

Il est intéressant de noter que certains de ces facteurs anti-angiogéniques sont produits par des cellules normales et que leur sécrétion diminue lorsque les cellules dérivent vers un stade tumoral. En effet, au cours des premiers passages de culture, des fibroblastes humains sécrètent la thrombospondine-1. Leur passage progressif vers le stade de cellules cancéreuses entraîne une chute de production de la thrombospondine et parallèlement une production d'inducteurs d'angiogenèse. Quelques données concernant les variations de production de ces facteurs anti-angiogéniques lors du développement tumoral commencent à être connues (Bouck et al., 1996). Ces informations suggèrent l'existence *in vivo* d'une balance entre le « taux » de facteurs angiogéniques et le « taux » de facteurs anti-angiogéniques (Hanahan and Folkman, 1996). La quiescence des vaisseaux serait due à la présence dans les tissus environnant d'une majorité de facteurs inhibiteurs d'angiogenèse. A l'inverse, la production massive d'activateurs d'angiogenèse ou la diminution du taux d'inhibiteurs induiraient le passage à un stade d'activation et donc au déclenchement du processus angiogénique. Eventuellement, les taux d'inhibiteurs et d'activateurs d'angiogenèse pourraient aussi augmenter en parallèle mais en privilégiant un déséquilibre en faveur du processus angiogénique. La Figure 8 illustre cette balance entre facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques.

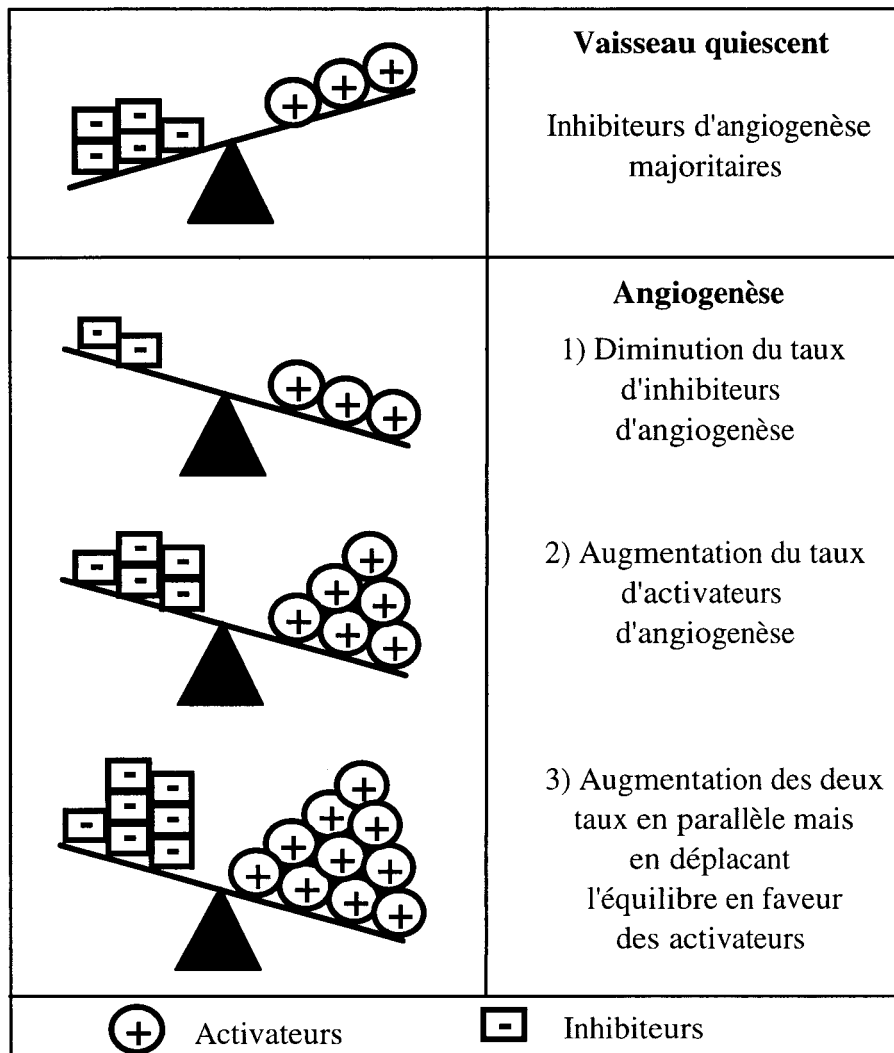


Figure 8: Balance entre facteurs angiogéniques et facteurs anti-angiogéniques

Dans les vaisseaux quiescents, le taux d'inhibiteurs de l'angiogenèse serait majoritaire alors que l'activation du processus serait le résultat soit d'une diminution du taux d'inhibiteurs soit d'une augmentation du taux d'activateurs d'angiogenèse soit d'une augmentation des deux taux à la fois.

2) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire

La migration des cellules endothéliales pour former un nouveau vaisseau sanguin implique une dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire au point de formation du nouveau vaisseau. Comme le démontrent des tests *in vitro* de migration de cellules endothéliales à travers les collagènes de type IV et V, ces cellules possèdent des activités protéolytiques capables de dégrader ces substrats (Kalebic et al., 1983). Il faut toutefois noter que ces dégradations ont d'autres conséquences que la simple ouverture d'un passage pour les cellules en migration. Elles sont également à l'origine d'une part de la génération de produits de dégradation dont l'activité sur les cellules endothéliales a été démontrée et d'autre part de la libération de facteurs emprisonnés dans cette matrice.

Actuellement, ont été mises en évidence deux voies majeures non indépendantes impliquées dans ces dégradations : la voie passant par le système de l'activateur du plasminogène et la production de la plasmine, et la voie des métalloprotéinases. Ces voies de dégradation sont contrôlées à plusieurs niveaux : 1) au niveau transcriptionnel, des facteurs angiogéniques régulent la transcription des gènes codant ces protéases, 2) au niveau de leur activation, ces enzymes sont sécrétées sous une forme inactive qui devient fonctionnelle après clivage, 3) au niveau de leur inhibition, ces enzymes actives sont contrôlées par des inhibiteurs spécifiques.

Le plasminogène est un proenzyme qui peut être activé en plasmine soit par le *tissue-type plasminogen activator* (t-PA) soit par l'*urokinase-type plasminogen activator* (u-PA). Outre les capacités de la plasmine à dégrader des composants de la matrice extra-cellulaire (la fibronectine, la laminine), elle active également des métalloprotéinases responsables d'autres dégradations. *In vitro*, des cellules endothéliales en migration ont une activité de type uPA qui augmente ; à l'arrêt de leur mouvement, cette activité retrouve un niveau basal (Pepper et al., 1987). Parallèlement, l'expression du récepteur de l'uPA augmente à la surface des cellules endothéliales en migration (Pepper et al., 1993). La présence du récepteur de l'uPA sur ces cellules endothéliales a plusieurs conséquences. L'activateur du plasminogène se retrouve donc fixé à la membrane des cellules, ce qui suggère un contrôle strict de la localisation de l'activité protéolytique dans le processus. De plus, après fixation d'un inhibiteur à ce complexe, le récepteur, l'uPA et l'inhibiteur pourraient être internalisés pour être dégradés, ce qui suggère en plus un contrôle temporel rigoureux de l'activité enzymatique. Par hybridation *in situ*, l'expression des transcrits de l'uPA a été décrite dans les cellules endothéliales au cours du processus de neovascularisation de la décidue. Les transcrits codant son inhibiteur, le *Plasminogen Activator-Inhibitor type 1* (PAI-1) ont également été détectés au cours de cette neovascularisation non pas dans les cellules endothéliales mais dans les cellules voisines (Bacharach et al., 1992) suggérant à nouveau un contrôle rigoureux de cette activité protéolytique. Les animaux dont le gène PAI-1 a été inactivé ne présentent aucun phénotype en relation avec l'angiogenèse (Carmeliet et al., 1993). Toutefois, la déficience en PAI-1 chez ces animaux a pu être compensée par l'activité d'autres inhibiteurs (PAI-2 ou $\alpha 2$ antiplasmine par exemple). Il faut cependant noter que la fonction des activateurs du plasminogène dans la dégradation de la membrane basale ou de la matrice extra-cellulaire au cours du processus angiogénique n'est pas encore bien établie. A l'exception de la décidue, l'expression de l'uPA dans les cellules endothéliales est assez rare *in vivo* (Grevin et al., 1993; Wernert et al., 1994). D'autre part, les animaux déficients en uPA ou en tPA n'ont pas de phénotype clairement différent des animaux normaux du point de vue de l'organisation

vasculaire ce qui ne permet pas de conclure quant au rôle de ces protéases dans la dégradation des matrices au cours du développement des vaisseaux sanguins (Carmeliet et al., 1994). Il n'est cependant pas exclus que les déficiences en tPA ou uPA aient été compensées par d'autres voies de dégradation ou que la production de ces protéases soit assurée par des cellules voisines (des fibroblastes).

Les métalloprotéinases (MMP) sont des enzymes qui dégradent des composants de la membrane basale ou de la matrice extra-cellulaire, également impliquées dans le processus angiogénique. Ces enzymes ont la particularité de posséder un ion zinc au niveau de leur site actif. Elles sont regroupées en 4 catégories : (1) les collagénases interstitielles (MMP-1, MMP-8, collagénase3), (2) les collagénases de type IV (MMP-2 ou 72kD-gélatinase, MMP-9 ou 92kD-gélatinase), (3) les stromélysines (-1 ou MMP-3, -2 ou MMP-10, matrilysin ou MMP-7), (4) les MT-MMP (*membrane type MMP*). Chaque catégorie d'enzyme a une spécificité de substrat et ces protéases peuvent également être inactivées par leurs inhibiteurs, *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*, (TIMP). *In vitro* et *in vivo*, plusieurs d'entre elles sont exprimées (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9), ainsi que leurs inhibiteurs (TIMP-1 et TIMP-2), par les cellules endothéliales et ces expressions sont modulées par des facteurs angiogéniques (revue Mignatti and Rifkin, 1996). Des inhibiteurs de la métalloprotéinase MMP-2 bloquent l'angiogenèse dans des sarcomes de Kaposi (revue Mignatti and Rifkin, 1996) ce qui suggère une fonction pour cette métalloprotéinase dans le processus angiogénique.

3) La migration et la prolifération des cellules endothéliales

La migration et la prolifération des cellules endothéliales font suite à la dégradation des matrices périphériques. Dans les capillaires qui irriguent les tissus sains, les cellules endothéliales se divisent tous les 7 à 10 ans (Engerman et al., 1967) ; dans les tumeurs elles se divisent 30 à 40 fois plus rapidement (Denekamp and Hobson, 1982; Tannock, 1970). *In vitro*, de nombreux facteurs angiogéniques ont la propriété d'induire la migration ou la prolifération des cellules endothéliales (voir tableau des facteurs angiogéniques). D'autre part, la voie Ras de transduction du signal serait requise pour induire un mouvement rapide des cellules endothéliales bien que l'expression de l'oncogène Ha-ras, entraîne une migration plutôt anarchique des cellules (Fox et al., 1994). En revanche, *in vivo*, les mécanismes qui contrôlent l'induction et la régulation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales sont encore peu connus.

4) *L'adhérence des cellules endothéliales*

L'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extra-cellulaire joue un rôle essentiel dans plusieurs phases du processus angiogénique. La migration, la prolifération, l'alignement, la survie et la capacité à envahir la matrice pour former de nouveaux tubes sont dépendants de l'adhérence des cellules aux structures voisines. Les récepteurs d'adhérence cellulaire, en étroite relation avec le cytosquelette, déterminent également l'architecture d'un tissu. Le complexe protéique qui assure l'ancrage de la cellule à la matrice correspond à une structure appelée plaque focale d'adhérence. Cette structure comprend les protéines de la membrane basale ou de la matrice extra-cellulaire, les récepteurs d'adhérence reconnaissant les protéines de la matrice ou d'autres récepteurs, et enfin toutes les molécules de pontage entre le récepteur et le cytosquelette. Les plaques focales d'adhérence sont ainsi responsables de l'étalement des cellules à un support mais assurent également la transduction de signaux au sein des cellules (Gumbiner, 1996).

Les protéines de la matrice extra-cellulaire intervenant dans l'établissement de ces plaques focales d'adhérence sont reconnues par les récepteurs d'adhérence au niveau de séquences peptidiques consensus de type RGD (identifiée au niveau de la fibronectine, de la vitronectine, de la laminine) ou de type YIGSR (identifiée au niveau de la laminine, Jockusch et al., 1995).

i) Les récepteurs d'adhérence :

Les récepteurs d'adhérence exprimés à la surface des cellules sont classés en cinq familles : les intégrines, les protéoglycannes, la superfamille des immunoglobulines, les cadhérines et les sélectines (revue Gumbiner, 1996; Polverini, 1996). Les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extra-cellulaire sont principalement assurées par les intégrines. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires composés d'une association non covalente médiée par plusieurs ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} entre une sous unité α et une sous unité β . Ces récepteurs sont formés d'un domaine extra-cellulaire de grande taille (environ 1000 acides aminés pour la sous unité α et 750 acides aminés pour la sous unité β), d'un domaine transmembranaire et d'un court fragment cytoplasmique (Schwartz et al., 1995). Le domaine extra-cellulaire s'associe aux protéines de la matrice extra-cellulaire (cette association est dépendante du calcium et du magnésium) alors que le domaine intra-cellulaire est en relation directe avec le cytosquelette. Actuellement, 15 sous unités α et 8 sous unités β ont été identifiées. En s'associant, elles forment 20 récepteurs différents identifiés à ce jour capables de reconnaître un ou plusieurs composants de la matrice extra-cellulaire (Tableau 3, revue Beauvais-Jouneau and Thiery, 1997; Hynes, 1992).

intégrine	β 1	β 2	β 3	β 4	β 5	β 6	β 7	β 8
α 1	Coll. Lam.							
α 2	Coll. Lam. Tenascine							
α 3	Coll. FN Entactine							
α 4	FN VCAM-1						FN VCAM-1	
α 5	FN Coll. dénat.							
α 6	Lam.			Lam.				
α 7	Lam.							
α 8	FN VN Tenascine							
α 9	Tenascine							
α V	FN VN		VN ; TSP ; vWF FN ; FG ; Coll. Osteopontine Tenascine		VN FN	FN Tenascine		VN
α IIb			VN ; FG ; vWF FN ; TSP					
α E								
α X								
α M		Facteur X FN ICAMs						
α L		ICAMs						

Tableau 3: Les récepteurs intégrines et leur propriétés de reconnaissance

Ce tableau illustre les associations connues entre les sous unités α et β des intégrines pour la reconnaissance des molécules de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire.

Coll, collagène ; Lam, laminine ; VN, vitronectine ; FN, fibronectine ; FG, fibrinogène ; vWF, facteur von Willebrand ; TSP, thrombospondine.

De nombreux récepteurs de type intégrine sont exprimés par les cellules endothéliales : α 1 β 1, α 2 β 1, α 5 β 1, α 4 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α v β 3 ; de plus, l'expression de la sous unité β 4 a été décrite au cours du développement du coeur (Brooks et al., 1994; Hierck et al., 1996; Hierck et al., 1996; Poverini, 1996). Comme pour de nombreuses autres molécules, l'obtention d'animaux dont les gènes codant ces intégrines ont été inactivés apportent des informations sur leurs fonctions. La formation des vaisseaux est particulièrement perturbée par l'absence des sous unités d'intégrine α 5 (Yang et al., 1993) et α v (communication de Blader et Hynes dans Fässler et al., 1996). Au cours du développement des animaux déficients en intégrine α 5, le système vasculaire extra-embryonnaire ne se forme pas. Les animaux déficients en α v ont de nombreuses hémorragies dues à des malformations au niveau de leur réseau vasculaire. Cependant, sachant que plusieurs récepteurs de type intégrine sont capables de reconnaître les mêmes glycoprotéines de la matrice extra-cellulaire, il est possible que l'absence de phénotype majeur dans les

expériences d'inactivation de gène de certaines intégrines soit due à la redondance de fonction au sein de la grande famille des intégrines. Il est donc impossible d'exclure toute fonction aux autres intégrines dans le processus angiogénique. Le rôle du récepteur $\alpha\beta 3$ au cours de l'angiogenèse est particulièrement intéressant. Son expression est en effet corrélée avec le développement de nouveaux vaisseaux sanguins (par exemple dans la cicatrisation de blessures, dans la rétinopathie diabétique) et elle est induite *in vitro* par des cytokines (FGF-2) dans des cellules endothéliales humaines de capillaire (Clark et al., 1996; Enenstein et al., 1992). De plus, des anticorps anti- $\alpha\beta 3$ ou anti-peptide RGD inhibent l'angiogenèse dans le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne du Poulet (Brooks et al., 1994). Dans cette expérience, seuls les vaisseaux en cours de développement sont affectés par la présence de ces anticorps, les vaisseaux déjà établis ne subissent aucun préjudice. Une étude approfondie a révélé que le dépôt de ces anticorps sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet provoque une augmentation de quatre fois du taux d'apoptose. Ces résultats suggèrent que l'ancrage des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha\beta 3$ est essentiel pour la survie des cellules. Suite à une apoptose massive, les antagonistes de $\alpha\beta 3$ induisent également une régression des tumeurs dans laquelle ils ont été injectés démontrant ainsi l'importance de cette intégrine dans le processus angiogénique normal et tumoral (Brooks et al., 1994).

Récemment, une nouvelle fonction vient d'être attribuée à l'intégrine $\alpha\beta 3$ au cours du processus angiogénique. *In vitro*, la métalloprotéinase MMP-2 interagit par sa partie carboxy-terminale avec le récepteur $\alpha\beta 3$ exprimé à la surface de cellules de mélanome CS-1 et cette interaction empêche les cellules d'adhérer à la vitronectine mais n'inhibe pas l'activité protéolytique de la métalloprotéinase. D'autre part, l'intégrine $\alpha\beta 3$ et la métalloprotéinase MMP-2 sont co-exprimées au cours de l'angiogenèse qui se développe dans la membrane chorio-allantoïdienne de poulet induite par le FGF-2 (Brooks et al., 1996). Cette interaction suggère un contrôle, par les récepteurs d'adhérence, de l'activité protéolytique nécessaire lors de processus invasifs tels que l'angiogenèse.

A la surface de cellules embryonnaires de rein humain, le récepteur de l'uPA s'associe à la sous-unité intégrine $\beta 1$ et entraîne une perte d'adhérence à la fibronectine préalablement médiée par le récepteur $\beta 1$ et un gain d'adhérence à la vitronectine alors possible grâce au récepteur à l'uPA (Wei et al., 1996). Cette association qui reste à démontrer dans les cellules endothéliales où s'expriment le récepteur à l'uPA et l'intégrine $\beta 1$ suggère à nouveau une étroite association entre l'adhérence des cellules et une activité protéolytique.

Les protéoglycannes, et notamment les syndécans, participent également aux interactions entre les cellules et la matrice extra-cellulaire. Leurs propriétés biochimiques ont été décrites (fixation, indépendante du calcium et du magnésium, aux collagènes I, III, V, à la fibronectine, à la thrombospondine, à la tenascine), mais leur fonction exacte dans l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice reste peu connue. Les molécules de la famille des immunoglobulines (les ICAMs, *InterCellular Adhesion Molecules* ; VCAM-1, *Vascular Adhesion Molecule 1* ; CD31 ou PECAM, *Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule*), les cadhérines et les selectines sont plutôt impliquées dans les interactions des cellules endothéliales entre elles ou avec d'autres cellules telles que les plaquettes ou les leucocytes (Polverini, 1996). Peu d'informations sont actuellement connues quant à l'implication de ces récepteurs d'adhérence cellule/cellule au cours du processus angiogénique. Toutefois, les formes solubles de VCAM-1 ou de la E-sélectine ont des propriétés angiogéniques (Koch et al., 1995). Des travaux récents indiquent une fonction pour PECAM dans le processus angiogénique puisque des anticorps anti-PECAM inhibent la néovascularisation dans la cornée induite par le bFGF (DeLisser et al., 1997). Enfin, des cellules ES déficientes en VE-cadhérine ne sont plus capables de se différencier selon la lignée endothéliale (Vittet et al., 1997) ce qui suggère une fonction pour la VE-Cadhérine dans ce processus.

ii) Les molécules de pontage entre le récepteur et le cytosquelette :

Entre les fibres d'actine et le récepteur d'adhérence cellulaire de type intégrine, s'intercale un complexe de protéines cytoplasmiques. Ce complexe protéique est impliqué dans la stabilisation du réseau d'actine et dans la transduction de signaux permettant aux cellules de s'adapter aux variations du milieu extérieur. Ainsi les cellules endothéliales constamment soumises au flux sanguin subissent l'effet de forces variables auxquelles elles peuvent alors répondre par l'intermédiaire de ces complexes. La plaque focale d'adhérence est une structure hautement dynamique capable de s'assembler ou de se désagréger en quelques minutes. Les protéines cytoplasmiques de la plaque focale d'adhérence peuvent être classées en plusieurs catégories. Les éléments dits structuraux sont composés des protéines du cytosquelette en général (l'actine, la filamine, la tenuine, l' α -actinine et la vinculine) et des protéines associées aux extrémité des filaments d'actine (la radixine, la tensine et la taline). Les éléments régulateurs de la plaque focale sont la profiline, la gelsoline et MARCKS (*myristoylated alanine-rich C-kinase substrate*) toutes trois impliquées dans la régulation de la polymérisation des filaments d'actine, des protéines riches en proline (VASP, *vasodilatator-stimulated phosphoprotein*, la zyxine etc),

des protéines riches en consensus de cystéines (la paxilline), des protéases (la calpaine II), la phospholipase C γ , des protéines kinases (des sérine/threonine kinases, des tyrosine kinases dont celles de la famille src ou FAK, *focal adhesion kinase*) et des petites protéines G (Rho), (revue Jockusch et al., 1995).

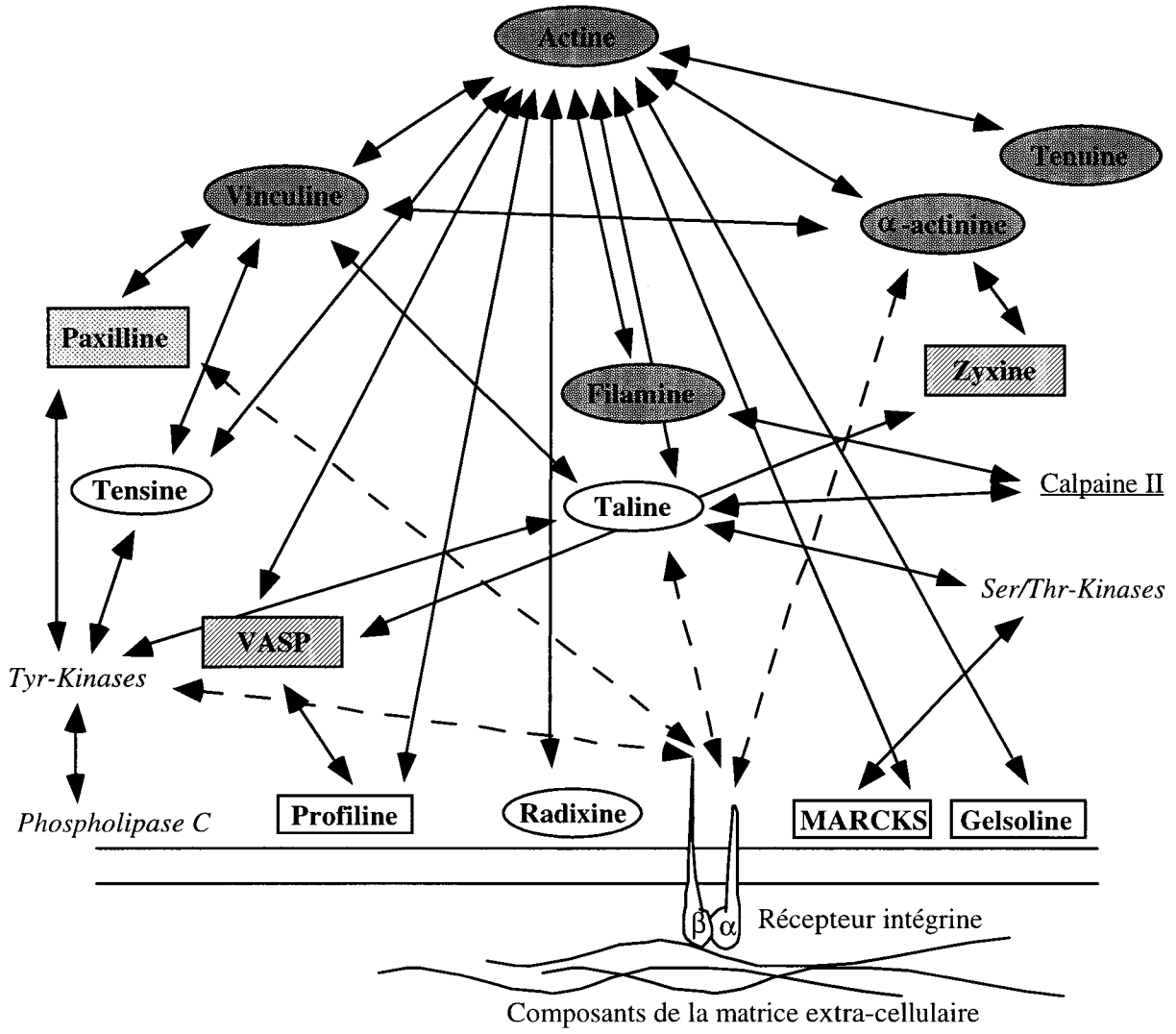


Figure 9: Interactions connues entre les différents composants de la plaque focale d'adhérence
 Les flèches pleines représentent les interactions cytoplasmiques, les flèches en pointillés représentent les interactions avec les récepteurs membranaires. Les éléments représentés par une forme ovale sont des protéines du cytosquelette ou des protéines impliquées dans sa stabilisation. Les rectangles représentent les protéines régulatrices de la plaque focale d'adhérence. Les protéases sont soulignées et les éléments impliqués dans les cascades de transduction du signal sont mentionnés en italique. (Complété d'après Jockusch et al., 1995).

In vitro, l'organisation du cytosquelette et des plaques focales d'adhérence des cellules endothéliales intervient dans la régulation de la formation de structures alignées ou de type tube par ces cellules. Des cellules endothéliales mises en culture sur du plastique présentent un cytosquelette peu organisé alors que leur ensemencement en présence du peptide YIGSR (la

séquence consensus de la laminine reconnue par les intégrines) induit une réorganisation du cytosquelette en fibres bien alignées traversant la cellule entière (Grant and Kleinman, 1997). D'autre part, le cytosquelette de cellules endothéliales formant des structures de type capillaire sur Matrigel est réorganisé de telle sorte que les filaments d'actines sont orientés le long de l'axe du pseudo-capillaire (Grant et al., 1991). De plus, des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) introduites entre deux gels de collagène s'organisent en structure de type tube et parallèlement, une diminution de l'expression de la vinculine, de la taline, de l' α -actinine et de l'actine est observée. Cette diminution d'expression des molécules de la plaque focale d'adhérence est à nouveau renversée si les cellules ne sont plus soumises à l'influence du gel de collagène supérieur par retrait de celui-ci (Deroanne et al., 1996). Ces exemples suggèrent l'importance de réorganisations du cytosquelette au cours du processus angiogénique non seulement au niveau de sa structure par des modifications directes du réseau d'actine mais également au niveau de ses relations avec la membrane cellulaire par l'intermédiaire de ces molécules de pontage.

5) *La morphogenèse et la maturation des capillaires*

La maturation d'une structure vasculaire naissante passe par la mise en place de la structure tubulaire, le rétablissement des jonctions cellulaires, le recrutement et la différenciation des cellules périvasculaires (cellules musculaires lisses, péricytes, fibroblastes) à partir de cellules mésenchymateuses voisines et la production de la membrane basale. Ces différents événements sont étroitement liés ; ainsi, la synthèse de la membrane basale et de la matrice extracellulaire est non seulement assurée par les cellules endothéliales mais également par des cellules périvasculaires.

L'apparition d'une vacuole dans les cellules endothéliales pourrait être à l'origine de la formation de la lumière du nouveau vaisseau. Ces vacuoles ont été observées dans des cultures de cellules endothéliales en présence de milieu conditionné par des cellules tumorales et ont précédé la formation d'une structure de type capillaire (Folkman and Haudenschild, 1980). En gel de collagène, une pinocytose dépendante de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est à l'origine de la formation de ces vacuoles (Davis and Camarillo, 1996). Un enroulement de la cellule endothéliale sur elle-même pourrait également être à l'origine de la formation de la lumière (Folkman, 1984). *In vivo*, les mécanismes de formation du tube et de la lumière des nouveaux vaisseaux sanguins ne sont pas encore élucidés.

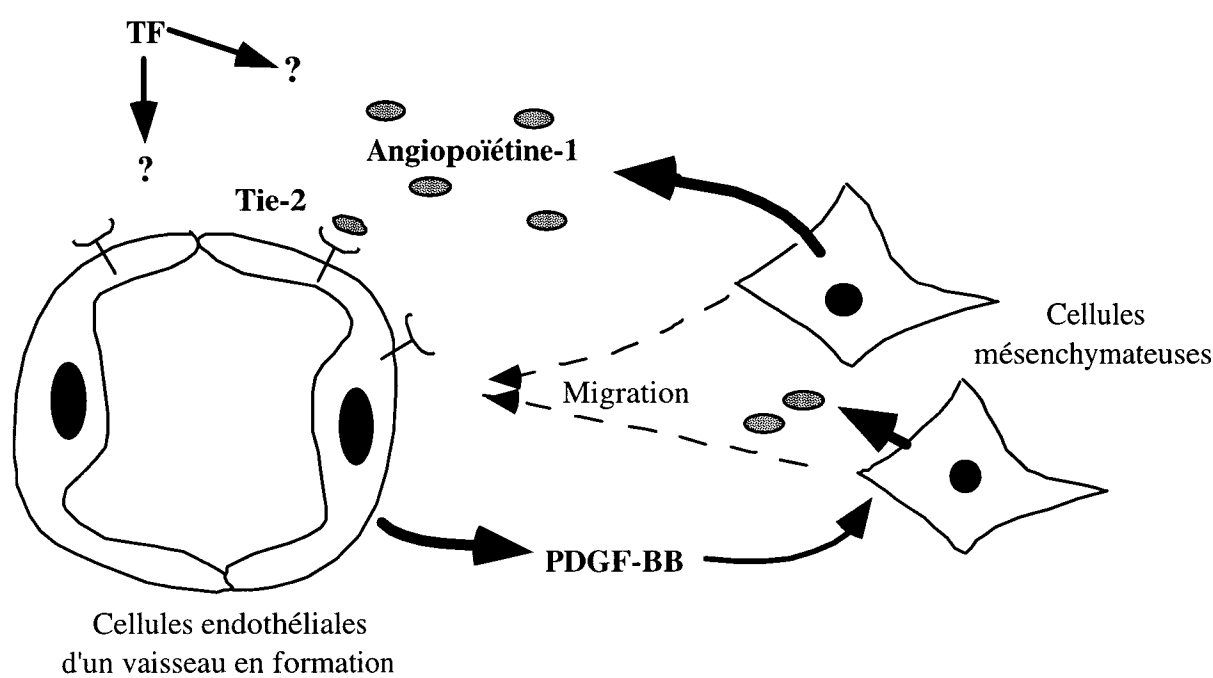
Quatre facteurs sont actuellement impliqués dans le recrutement des cellules périvasculaires (principalement les cellules musculaires lisses et les péricytes) : l'angiopoïétine et

son récepteur Tie-2 (ou tek), le PDGF et son récepteur de type β , le TGF- β 1 et son récepteur de type 2 et enfin le facteur tissulaire TF. Des données *in vitro* ainsi que le phénotype des animaux déficients en ces différents facteurs apportent une série d'arguments en faveur de leur fonction dans la maturation des vaisseaux sanguins.

L'angiopoïétine-1, un ligand pour le récepteur de type tyrosine kinase Tie-2 a été découverte au moyen d'une nouvelle technique permettant de repérer des cellules isolées, productrices du ligand pour un récepteur connu, au sein d'une population cellulaire. Au cours du développement embryonnaire de la souris, cette glycoprotéine s'exprime dans le myocarde au niveau du coeur mais également dans les cellules mésenchymateuses à la périphérie des vaisseaux sanguins en formation (Davis et al., 1996). Les embryons de souris déficients en angiopoïétine-1 meurent au stade 12.5 dpc et présentent un réseau vasculaire très homogène en structure ainsi que des cellules endothéliales moins étalées et une absence de cellules périvasculaires (Suri et al., 1996). Les animaux déficients en Tie-2 se caractérisent également par des malformations au niveau du réseau vasculaire, notamment par une homogénéité des vaisseaux, et par l'absence de bourgeonnement capillaire au niveau du neurectoderme (Sato et al., 1995). Des embryons déficients en TGF- β 1 meurent suite à de sévères malformations du réseau vasculaire au niveau du sac vitellin (Dickson et al., 1995). La déficience en récepteur de type 2 du TGF- β donne un phénotype similaire (Oshima et al., 1996). De même, les embryons déficients en PDGF-B ou l'une des sous unités de ses récepteurs, le PDGF-R β , meurent suite à des hémorragies et leur réseau vasculaire est caractérisé par l'absence de péricytes (Leveen et al., 1994; Lindahl et al., 1997; Soriano, 1994). Enfin, les embryons déficients en facteur tissulaire (TF), un membre de la famille des récepteurs à cytokines ayant une fonction dans la voie extrinsèque de la coagulation sanguine en s'associant au facteur VII (Camerer et al., 1996), meurent également suite à l'absence de recrutement de cellules périvasculaires (Carmeliet et al., 1996). Parallèlement, des résultats obtenus *in vitro* viennent renforcer l'implication de ces facteurs dans le recrutement et la différenciation des cellules périvasculaires. Ainsi, le TGF β est activé lors d'interactions entre les cellules endothéliales et les cellules mésenchymateuses indifférenciées ou les cellules différenciées, musculaires lisses ou péricytes. Le TGF- β activé induit *in vitro* la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses ou en péricytes (revue (Beck and D'Amore, 1997)). Enfin, le PDGF-BB sécrété par les cellules endothéliales a un effet chemoattractant sur les cellules musculaires lisses et stimule leur prolifération (Beck and D'Amore, 1997).

L'ensemble de ces informations a permis de proposer un modèle de recrutement et de différenciation des cellules mésenchymateuses (Beck and D'Amore, 1997; Folkman and D'Amore, 1996), Figure 10. Dans ce modèle, la plupart des données expérimentales sont prises en considération à l'exception du rôle du facteur tissulaire (TF) dont la fonction précise dans le recrutement des cellules périvasculaires reste encore à déterminer.

Recrutement des cellules mésenchymateuses



Différenciation des cellules périvasculaires et dépôt de la matrice extracellulaire

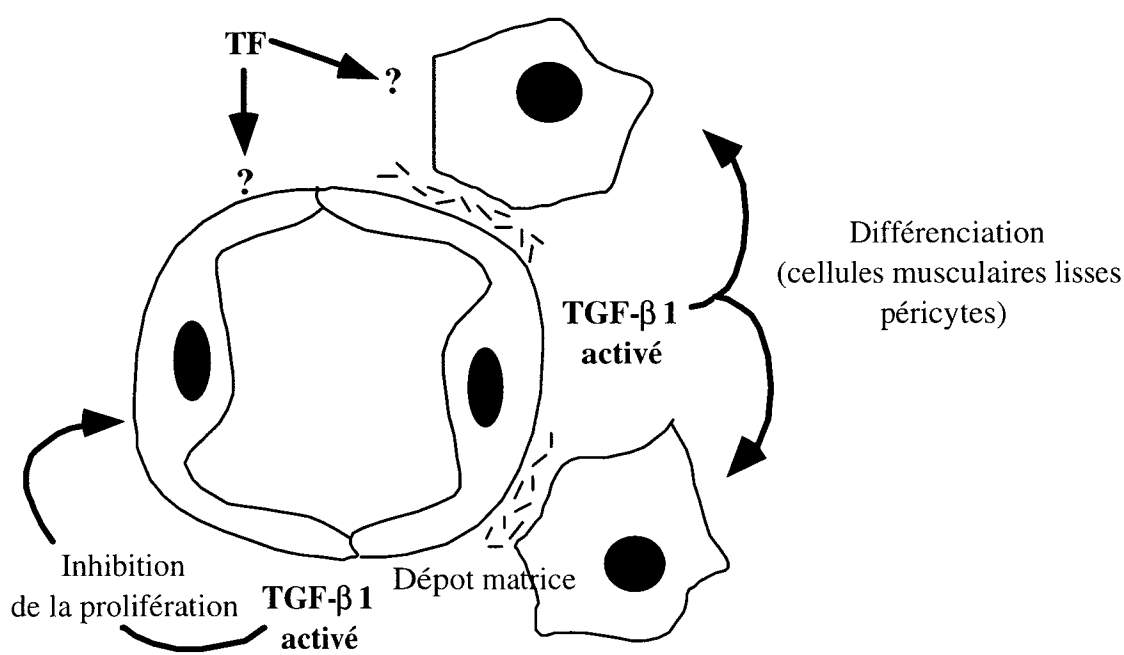


Figure 10: La maturation des vaisseaux par recrutement de cellules voisines

Le recrutement des cellules mésenchymateuses serait dû à l'action de deux molécules, le PDGF et l'angiopoïétine1 qui entraîneraient la migration de ces cellules vers le nouveau vaisseau. La différenciation des cellules serait due à l'activation du TGF- β 1. Le facteur tissulaire (TF, *tissue factor*) jouerait un rôle non encore connu dans ce processus.

En ce qui concerne la synthèse de la nouvelle membrane basale et de la matrice extra-cellulaire, de nombreuses études décrivent la synthèse des composants extra-cellulaires non seulement par les cellules endothéliales mais également par d'autres types cellulaires (fibroblastes). Depuis une dizaine d'années, il est établi que les cellules endothéliales synthétisent divers composants de la matrice extra-cellulaire. La production de collagènes, ainsi que de fibronectine ou de thrombospondine, par des cellules endothéliales de boeuf en culture a déjà été évoquée (Sage et al., 1981). De plus, *in vitro*, des cellules endothéliales issues de l'aorte ou de la cornée de boeuf produisent, en quantité variable, deux composants de la membrane basale, la laminine et la fibronectine (Gospodarowicz et al., 1981), ce dernier composant est également synthétisé par des cellules endothéliales humaines (Jaffe and Mosher, 1978). Le fait que la production de cette matrice soit ultérieure ou concomitante à l'organisation des cellules endothéliales en un capillaire reste à déterminer.

C. Pourquoi tenter de contrôler le processus angiogénique ?

Contrôler le processus angiogénique dans un but thérapeutique pourrait être envisagé soit par induction de nouveaux vaisseaux sanguins afin de palier à un défaut dans l'organisme soit par blocage d'une angiogenèse naissante afin de réduire voire même d'anéantir une pathologie.

a) Quels sont les intérêts de réussir à contrôler l'angiogenèse?

Une « thérapie par induction d'une angiogenèse » peut être envisagée dans différentes affections. Les ischémies cardiaques, périphériques (au niveau des membres inférieurs) ou cérébrales pourraient être soignées par induction de vaisseaux sanguins collatéraux. La guérison de fractures ou de blessures pourrait être accélérée par la stimulation d'une angiogenèse. De nombreux modèles animaux sont actuellement utilisés pour tester l'efficacité de ces thérapies. Un modèle d'ischémie du myocarde chez le chien, le cochon ou le rat est utilisé pour tester l'efficacité de l'injection de facteurs angiogéniques dans la zone ischémiée. L'effet bénéfique de l'induction de vaisseaux sanguins collatéraux a été clairement démontré dans des modèles d'ischémie du membre postérieur. Chez le lapin ou le rat, la ligature et l'excision de l'artère fémorale ont été surmontées par l'établissement de vaisseaux sanguins collatéraux suite à un traitement par le FGF-2, le VEGF ou le PDGF-BB (Revue Pepper, 1997). Différents moyens de délivrance de ces facteurs angiogéniques ont été appliqués *in vivo*. Leur injection a été réalisée en

intramusculaire ou directement dans l'artère et des traitements continus ont été réalisés par l'intermédiaire de petites pompes. L'injection directe de plasmide codant ces facteurs a même été tentée (notamment pour le VEGF) chez un patient, mais, bien qu'une circulation collatérale ait été obtenue, elle n'a pas suffi à préserver la jambe déjà atteinte d'une gangrène (Isner et al., 1996).

Le concept « d'une thérapie par inhibition de l'angiogenèse » est né de la lutte contre le développement tumoral et la formation de métastases (Folkman, 1972). Inhiber l'angiogenèse tumorale diminuerait la croissance des tumeurs et permettrait peut être de lutter contre le développement des métastases issues de l'échappement de cellules cancéreuses dans la circulation sanguine. De nombreuses cibles ont déjà été définies pour empêcher le développement de vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Chaque molécule impliquée dans l'induction et le développement de l'angiogenèse est une cible potentielle pour tenter d'inhiber le processus (Figure 11).

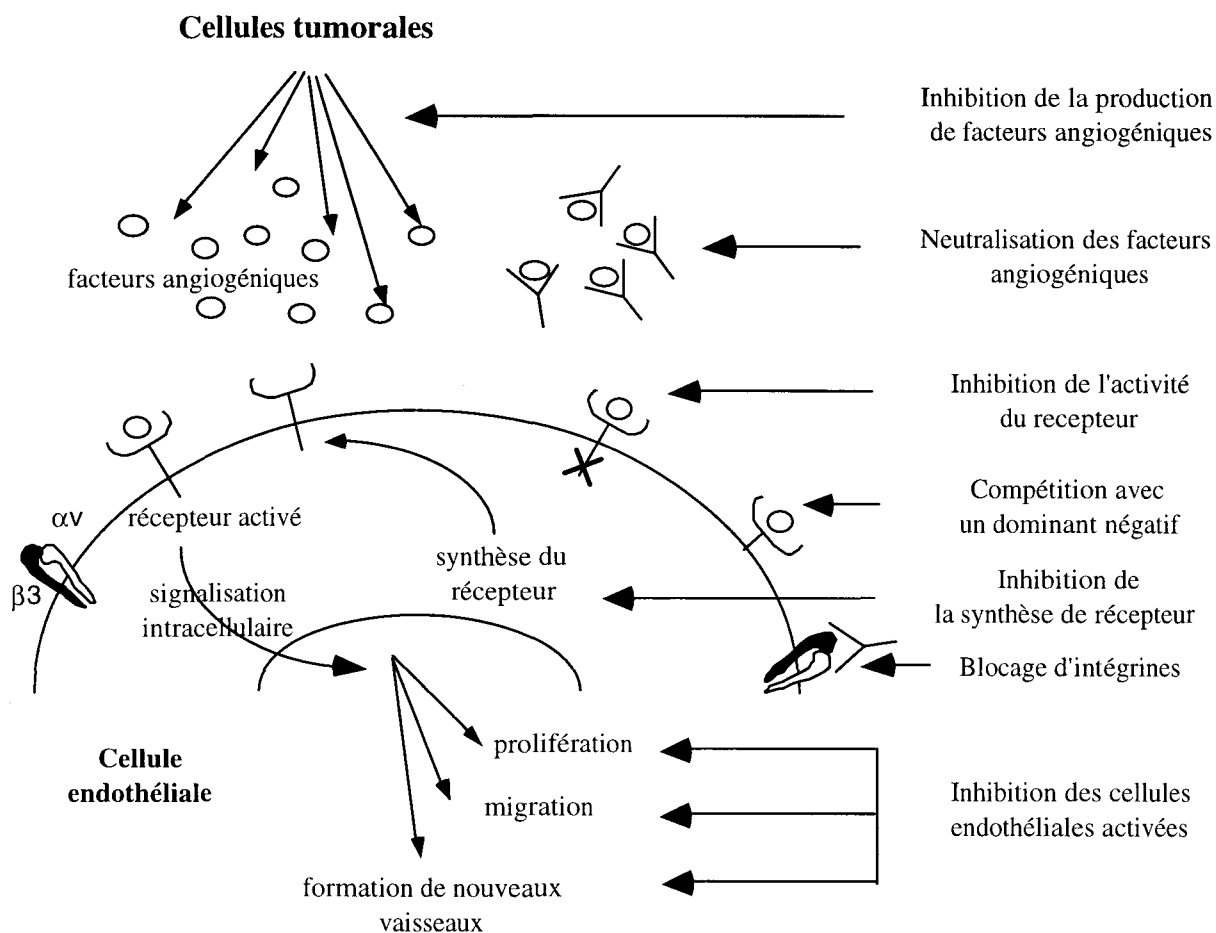


Figure 11: Les cibles d'inhibition de l'angiogenèse

Différents niveaux d'inhibition de l'angiogenèse sont déjà envisagés au vue des connaissances moléculaires sur le processus. Depuis la production des facteurs angiogéniques jusqu'à l'inhibition des cellules endothéliales activées, chaque étape du processus angiogénique devient une cible potentielle.

Il faut rester cependant prudent sur l'efficacité d'une thérapie de ce type dans la lutte contre le cancer. Si lutter contre le développement de nouveaux vaisseaux sanguins responsables d'un accroissement du volume tumoral semble être une stratégie séduisante, elle peut cependant ne pas être aussi efficace qu'attendue. En effet, sachant que l'angiogenèse tumorale est souvent décrite comme anormale, anarchique, mal organisée et où le flux sanguin peut s'inverser ou stagner (Fox et al., 1996), on conçoit difficilement qu'une destruction somme toute partielle de ce réseau relativement anarchique puisse perturber le développement tumoral au point de permettre son anéantissement. Récemment, des propositions de couplage de traitements ont été proposées, à savoir lutter parallèlement contre l'angiogenèse tumorale et les cellules cancéreuses elle mêmes. Ces propositions plus réalistes pourraient ouvrir de nouvelles voies d'approche dans ce domaine.

D'autres pathologies telles que les néovascularisations de l'oeil ou des plaques athérosclérotiques ou les hémangiomes sont concernées par la réussite de thérapies de type inhibition d'angiogenèse. La réussite de ces thérapies angiogéniques dépend surtout des avancées scientifiques sur la compréhension des mécanismes moléculaires qui induisent et régulent l'angiogenèse.

II. Les facteurs de transcription et l'angiogenèse

La technique d'hybridation *in situ* a permis d'identifier un certain nombre de gènes dont l'expression est associée à l'angiogenèse, ou dont l'expression est spécifique des cellules endothéliales. Cependant, l'étude de la régulation transcriptionnelle de ces gènes au cours de l'angiogenèse est peu abordée et peu de facteurs de transcription sont impliqués dans ce processus.

A. Le facteur de transcription HIF-1 et les membres de sa famille

Le facteur inductible par l'hypoxie, HIF (*Hypoxia inducible factor*), est un facteur de transcription qui fait partie de la famille des b(HLH)-PAS (*basic-helix-loop-helix-per-arnt-sim*) caractérisée par des domaines basiques et des domaines hélice-boucle-hélice. Cette famille comprend comme autres membres ARNT (*arylhydrocarbon-receptor nuclear translocator*), AHR (*arylhydrocarbon receptor*), et Sim (*Drosophila single-minded protein*) (Burbach et al., 1992; Ema et al., 1996; Hoffman et al., 1991; Wang et al., 1995). HIF-1 est composé de deux sous unités α et β ; il agit sous forme d'hétérodimère pouvant notamment s'associer avec d'autres membres de sa famille. L'hypoxie active ce facteur de transcription qui stimule alors la transcription de gènes répondant à l'hypoxie comme le VEGF ou l'érythropoïétine (Guillemin and Krasnow, 1997). Un modèle d'interaction de HIF-1 avec l'ensemble de la machinerie transcriptionnelle a été proposé : HIF-1 induirait la transcription de ses gènes cibles en s'associant avec deux protéines adaptatrices p300 et CBP (déjà connues pour interagir avec d'autres facteurs tels que jun, fos, cmyb) qui entreraient alors en contact avec toute la machinerie transcriptionnelle et induiraient la transcription (Arany et al., 1996).

Le facteur de transcription ARNT, issu de la même famille que HIF et formant des hétérodimères avec ce dernier, est également impliqué dans la réponse à l'hypoxie. Récemment, sa fonction dans l'angiogenèse a été démontrée par des expériences de recombinaison homologue (Maltepe et al., 1997). Le développement des souris ARNT^{-/-} ne dépasse pas le stade 10.5 dpc ; ces embryons présentent, entre autres, une angiogenèse anormale dans la vésicule vitelline, très comparable à celle qui a été décrite pour les embryons déficients en VEGF ou en TF.

B. Le facteur de transcription AP-2

Dans le promoteur du VEGF, une région riche en bases GC, indispensable pour l'expression constitutive du VEGF mais également pour son expression induite par le TGF α , a

été identifiée. Par des expériences de retard sur gel, des protéines reconnaissant cette séquence ont été isolées et caractérisées. Parmi elles, le facteur de transcription AP-2, fonctionnant sous forme de dimères et reconnaissant des séquences riches en GC, est considéré comme un candidat idéal pour l'activation de la transcription du VEGF induite par le TGF α (Gille et al., 1997). Indirectement, un rôle pour ce facteur de transcription a également été suggéré dans la régulation de l'expression de la 72-kDa gélatinase. En effet, la protéine adénovirale E1A de 243 acides amines réprime la transcription de la 72-kDa gélatinase en s'associant directement avec le facteur de transcription AP-2 (Somasundaram et al., 1996).

C. Les facteurs de transcription GATA-2 et GATA-3

Le rôle des facteurs de transcription, GATA-2 et GATA-3, a été démontré dans le cas très précis de l'angiogenèse placentaire. L'étude des zones placentaires des animaux déficients en GATA-2 (Tsai et al., 1994) ou en GATA-3 (Pandolfi et al., 1995), a révélé un défaut de neovascularisation dans la décidue en développement. Les milieux conditionnés issus de mise en culture de placentas d'animaux déficients en GATA-2 ont un pouvoir chémoattractant sur les cellules endothéliales réduit par comparaison avec ceux obtenus à partir de mises en culture de placenta normaux. Enfin, le taux d'expression de la proliférine, une hormone contrôlant positivement l'angiogenèse (Jackson et al., 1994), est particulièrement réduit dans le placenta des animaux déficients en GATA-2 (Ma et al., 1997).

D. Les facteurs de transcription de la famille NF- κ B et leurs inhibiteurs I κ B

In vitro, les cellules endothéliales expriment plusieurs membres de la famille NF- κ B. Les protéines p105/p50, p100/p52, p65, c-Rel et RelB ainsi que leurs transcrits ont été détectés dans les cellules endothéliales en culture (Collins et al., 1995). Récemment, par immunohistochimie, la protéine c-Rel a été détectée dans les cellules endothéliales de vaisseaux sanguins dans le thymus de poulet (Huguet et al., 1997). Parallèlement, les inhibiteurs de ces facteurs de transcription, I κ B- α , I κ B- β , bcl-3, p105 et p100 (dont la fonction est de séquestrer les membres de la famille NF- κ B dans le cytoplasme) sont également exprimés dans les cellules endothéliales. De plus, l'expression des membres de la famille NF- κ B est induite par divers facteurs dont le TNF- α qui est angiogénique.

Dans les cellules endothéliales, après translocation dans le noyau, ces facteurs de transcription (et plus particulièrement p50/p65) se fixent aux séquences cibles kB activant ainsi la transcription de la E-selectine (Lewis et al., 1994; Schindler and Baichwal, 1994; Whitley et

al., 1994), VCAM-1 (Neish et al., 1995), ICAM-1 (Hou et al., 1994) ou encore le facteur tissulaire TF (Mackman, 1995). Les récepteurs d'adhérence cellule/cellule (E-selectine, VCAM-1 ou ICAM-1) sont peu impliqués au cours du processus angiogénique mais le facteur tissulaire y joue un rôle important comme le démontre l'analyse des animaux TF^{-/-}.

E. Le facteur de transcription Ets1 et les membres de sa famille

Le facteur de transcription Ets1, qui fera l'objet d'une présentation plus détaillée dans la troisième partie, est également impliqué au cours du processus angiogénique. Son implication repose sur une analyse précise de son expression au cours du développement embryonnaire du poulet mais également dans de nombreuses tumeurs.

III. Les facteurs de transcription de la famille Ets

A. Découverte de Ets1 et naissance d'une grande famille

La famille Ets est née suite à la découverte d'un oncogène viral v-ets (*erythroid twenty six*), (Leprince et al., 1983; Nunn et al., 1983) dans le génome du rétrovirus aviaire E26 qui provoque des leucémies mixtes myéloïde et érythroïde chez le poulet (Graf et al., 1979; Ivanov et al., 1962). Le rétrovirus E26 ne contient pas uniquement l'oncogène v-ets mais également l'oncogène v-myb (*myeloblastosis*). La production d'une protéine de fusion p135^{gag-myb-ets} dans les cellules infectées est responsable des propriétés transformantes du rétrovirus (Metz and Graf, 1991). Le gène ets-1, l'homologue cellulaire de la forme oncogénique v-ets, est le premier membre identifié de la famille. Le point commun entre tous les membres de la famille Ets est une séquence protéique de 85 acides aminés appelée domaine ETS (Karim et al., 1990) correspondant au domaine de fixation à l'ADN de ces facteurs de transcription. De nombreux membres ont déjà été identifiés et se retrouvent à la fois chez les Invertébrés et les Vertébrés, dont l'oursin, la drosophile, le xénope, le poulet, la souris et l'homme (Lautenberger et al., 1992). Des comparaisons de séquences, au niveau du domaine ETS mais également sur d'autres séquences protéiques, entre différents membres issus de différentes espèces ont permis d'établir des groupes et des sous familles réunissant les membres les plus proches et de proposer un modèle d'évolution pour cette famille de facteurs de transcription (Vincent Laudet 1996 communication personnelle). Cette analyse phylogénique a permis de considérer au moins 12 groupes représentés dans la

Figure 12 à l'exception des groupes ERF et DETS4. Notre étude ayant porté sur la fonction du facteur de transcription Ets1, nous présenterons principalement les propriétés de ce facteur. Nous

préciserons cependant quelques informations sur d'autres membres et en particulier sur ceux qui peuvent jouer un rôle au cours de l'angiogenèse.

B. L'organisation du gène et les domaines protéiques fonctionnels

1. Le gène *ets1* :

Le gène *ets1*, son promoteur ainsi que ses transcrits ont été caractérisés chez différentes espèces. Entre le poulet, l'homme et la souris, des variations sur l'organisation du gène et ses caractéristiques ont été rencontrées. Le gène *ets1* de poulet est divisé en 10 exons répartis sur 60kbp d'ADN génomique. Trois transcrits sont produits ; un transcrit majeur de 7.5kb, et deux transcrits mineurs de 2.2 et 1.5 kb. Un épissage alternatif au niveau de l'extrémité 5' du gène est à l'origine de la synthèse de deux protéines distinctes p54 et p68 qui présentent une séquence commune en partie carboxy-terminale, mais différent dans leur partie amino-terminale (Duterque-Coquillaud et al., 1988; Leprince et al., 1988; Watson et al., 1988).

Chez l'homme, le gène *ets1* est situé sur le bras long du chromosome 11 (11q23-24) lieu d'actives translocations responsables de leucémies ou du sarcome d'Ewing (de Taisne et al., 1984) ; il contient 8 exons (A et III à IX) répartis sur 60kbp. Les épissages alternatifs des exons IV ou VII donnent naissance à quatre formes de transcrits. Ces transcrits sont détectés, par Northern blot, sous une forme majoritaire de 6.8kb. Un transcrit mineur de 3kb peu stable est également détecté ; il résulte d'un arrêt de la transcription à un site de polyadénylation interne (Collyn d'Hooghe et al., 1993). Dans des cellules T humaines, quatre protéines ont été identifiées dont les poids moléculaires apparents sont 51 (p51), 48 (p48), 42 (p42) et 39kDa (p39) ainsi que deux formes mineures de 52 et 49 kDa produits de la phosphorylation des protéines p51 et p48 (Koizumi et al., 1990). La cartographie du promoteur du gène *ets1* humain n'a pas permis d'identifier des séquences classiques de type *TATA box* ou *CAAT box* ; en revanche, des régions riches en GC, dont des séquences consensus pour les facteurs de transcription Sp1, AP-1, AP-2 sont présentes (Jorcyk et al., 1991).

Le gène *ets1* de souris est d'un point de vue structural très proche de son homologue humain (Chen, 1990). Son expression produit deux formes de transcrits, une forme majoritaire de 5.3 kb et une forme minoritaire de 2 kb. Du transcrit de pleine longueur est traduite une protéine de 58 kDa (p58) ; une protéine de plus petit poids moléculaire a également isolée : p50 (Bellacosa et al., 1994). Des formes protéiques phosphorylées ont aussi été caractérisées (Chen, 1990).

2. Les domaines fonctionnels de Ets1

a) Le domaine de liaison à l'ADN ou domaine ETS

Ce domaine, défini au sens strict par la séquence de 85 acides aminés qui caractérise la famille, n'a pas une localisation identique chez tous les membres (Figure 12). Différentes techniques expérimentales (compétition en retard sur gel, sélection d'oligonucléotides parmi des séquences choisies au hasard) ont permis d'établir que ce domaine reconnaît des séquences dont le motif central est GGAA/T (revue Karim et al., 1990). Cette séquence d'ADN riche en purines porte le nom de séquence EBS (*Ets binding site*). Le site potentiel de localisation nucléaire des protéines Ets est également inclus dans ce domaine de fixation à l'ADN (Boulukos et al., 1989). D'un point de vue structural, l'analyse cristallographique du domaine ETS de PU-1 et l'analyse par résonance magnétique nucléaire du domaine ETS de Ets1 ont mis en évidence une organisation du domaine en 3 hélices α (H1, H2, H3) et 4 feuillets β (Kodandapani et al., 1996; Werner et al., 1995). Les hélices H2 et H3 sont responsables des interactions entre le facteur de transcription et l'ADN. Le domaine de 85 acides aminés est capable, à lui seul, de se fixer à l'ADN. Néanmoins, les séquences proches de ce domaine influencent fortement ses capacités de liaison (Mavrathalassitis et al., 1994; Petersen et al., 1995; Werner et al., 1995).

Le domaine ETS n'a pas pour unique fonction de se lier à l'ADN avant une éventuelle activation ou inhibition de la transcription. C'est également un domaine d'interaction avec différents partenaires. Ce domaine peut interagir avec le domaine basique des protéines Jun (Bassuk and Leiden, 1995) formant alors un complexe qui recrutera ensuite une protéine Fos pour se fixer sur des séquence cibles de type EBS/AP-1 et activer la transcription. Inversement, l'interaction entre le domaine de fixation à l'ADN de Ets1 et la région basique de MafB, une protéine de la famille des facteurs de transcription Maf et proche d'AP-1, inhibe l'activité transcriptionnelle de Ets1 (Sieweke et al., 1996).

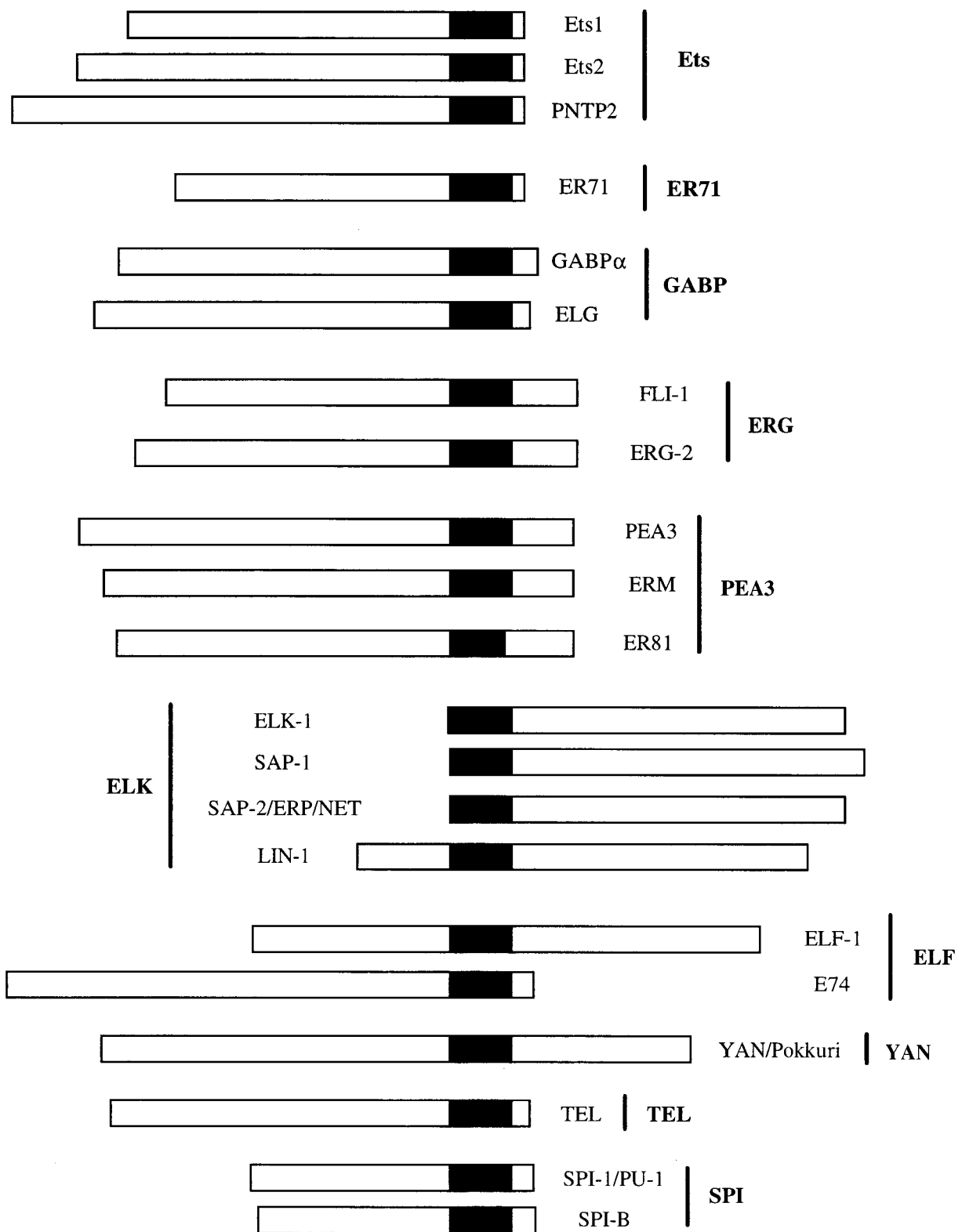


Figure 12 : Les membres de la famille Ets

La famille Ets a été divisée en 12 groupes ; 10 sont représentés dans cette figure d'après les données de Ghysdael et al 1997, seuls manquent les groupes ERF et DETS4. Le classement choisi tient compte de l'arbre phylogénétique établi par V. Laudet (1996). Le rectangle noir représente le domaine ETS.

b) Le domaine transactivateur

Contrairement au domaine de fixation à l'ADN, le ou les domaines transactivateurs ne sont pas conservés entre les membres de la famille Ets et leurs structures ne sont d'ailleurs pas non plus équivalentes. Ce domaine peut être de type acide (Elf1, Ets2), de type hydrophobe (Ets1), de type riche en glutamine (Spi1/Pu1), de type riche en proline ou riche en sérine/proline (erg, fli), (revue Crépieux et al., 1994). Cette grande variation dans la structure des domaines transactivateurs peut refléter une grande diversité d'interaction avec la machinerie transcriptionnelle, apportant peut être à chaque membre de la famille une spécificité de fonction. A l'exception de quelques membres pour qui des interactions *in vitro* avec la machinerie transcriptionnelle ont été établies (revue Ghysdael and Boueux, 1997), les mécanismes moléculaires nécessaires à l'activité des protéines Ets ne sont toujours pas connus à ce jour.

c) Les domaines régulateurs de la fixation à l'ADN

Deux domaines sont connus pour inhiber la fixation de ces facteurs de transcription à l'ADN. Ainsi, la région précédant le domaine de fixation à l'ADN (codée par l'exon VII humain) a un effet inhibiteur sur la fixation du facteur de transcription à l'ADN (Wasylyk et al., 1992). D'autre part, l'extrémité carboxy-terminale de la protéine Ets1 (et celle de son homologue viral) influence négativement les capacités de ces protéines à se fixer à l'ADN. La délétion de cette extrémité carboxy-terminale augmente d'un facteur 20 la capacité du facteur de transcription Ets1 à se lier à l'ADN (Hagman and Grosschedl, 1992). Parallèlement, le remplacement de cette extrémité par son équivalent viral entraîne une diminution des capacités de fixation à l'ADN de la protéine Ets1 cellulaire (Reddy and Rao, 1990). Les mécanismes responsables de cette inhibition ne sont pas réellement connus. Un modèle a cependant été proposé pour l'expliquer. Une interaction intramoléculaire entre la partie carboxy-terminale et une séquence interne de la protéine masquerait le domaine ETS et empêcherait la fixation à l'ADN de la protéine (Jonsen et al., 1996).

C. Les régulations de l'activité de Ets1

Outre les domaines régulateurs de la fixation à l'ADN évoqués précédemment, d'autres mécanismes (des modifications post-traductionnelles ou des association avec des co-facteurs) permettent non seulement un contrôle de la fixation des protéines à leurs séquences cibles mais également un contrôle de l'activité transactivatrice.

1. Les phosphorylations de la protéine

Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés dans la protéine Ets1. Ces phosphorylations affectent l'activité de Ets1 soit en inhibant sa fixation à l'ADN soit en modifiant ses capacités transactivatrices. Des résidus sérine situés dans la partie codée par l'exon VII peuvent être phosphorylés sous la dépendance du calcium (Fleischman et al., 1995; Koizumi et al., 1990; Pognonec et al., 1988). Ces phosphorylations inhibent la fixation à l'ADN de Ets1 sans affecter sa localisation nucléaire (Rabault and Ghysdael, 1994). Toutefois, ces phosphorylations ne concernent pas les protéines issues des transcrits épissés et dépourvues de la séquence codée par cet exon VII (Fisher et al., 1994). Les protéines Ets1 issues de ces transcrits épissés ne répondent donc pas aux mêmes mécanismes de régulations que les protéines de pleine longueur.

D'autre part, la thréonine 38 de la partie amino-terminale de la protéine Ets1 est également phosphorylée *in vitro* et, dans les fibroblastes stimulés par le sérum ; cette phosphorylation induit une diminution de l'activité du facteur de transcription (Rabault et al., 1996). En revanche, dans les fibroblastes, l'activation par Ras qui entraîne sa phosphorylation induit une augmentation de l'activité de Ets1 sur des promoteurs artificiels contenant des sites Ets et AP-1. Une mutation de la thréonine 38 en alanine abolit aussi complètement l'effet de l'activation par Ras sur les protéines Ets1 (Yang et al., 1996). La différence entre ces résultats pourrait s'expliquer par la différence entre les voies d'activation stimulées par le sérum et les voies stimulées par Ras. De plus, si l'influence des phosphorylations sur l'activité des protéines Ets1 est établie, le mécanisme qui induit ces effets n'est pas actuellement connu.

2. Les co-facteurs de Ets1

Nous avons déjà évoqué l'existence d'un partenaire pour Ets1 (MafB) se fixant au niveau du domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription et inhibant son activité (Sieweke et al., 1996). D'autres partenaires ont déjà été isolés et de ces associations résultent soit une stabilisation de fixation à l'ADN de Ets1 soit une augmentation du pouvoir transactivateur du facteur de transcription. Ainsi, *in vitro*, Ets1 et SP1 s'associent et se lient à des séquences de réponse aux protéines Ets dans le LTR (*long terminal repeat*) du virus HTLV1 (*human lymphotropic virus type 1*), (Gégonne et al., 1993). De plus, dans des tests de transactivation, Ets1 et SP1 activent en synergie la transcription à partir de ce même site (Gégonne et al., 1993). D'autre part, un site indispensable pour la régulation de la transcription du gène uPA a été caractérisé et contient à la fois un site de reconnaissance pour Ets1 et un site de reconnaissance

pour AP-1 (Nerlov et al., 1992). Ces deux sites sont indispensables à la transcription du gène uPA induite par le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) suggérant une coopération des facteurs Ets et AP-1 dans cette activité (Nerlov et al., 1992).

D. Des fonctions encore peu connues :

Trouver la ou les fonctions du facteur de transcription Ets1 n'est pas particulièrement aisé. Les travaux engagés dans ce sens reposent sur plusieurs approches. L'analyse des patrons d'expression de Ets1 a permis d'identifier les cellules et les processus dans lesquels ce facteur de transcription est susceptible de jouer un rôle. D'autre part, l'étude *in vitro* de différents promoteurs a permis de dresser une longue liste de gènes cibles putatifs (revue Ghysdael and Boureux, 1997). Ces gènes cibles putatifs sont certes intéressants mais ils ne présentent un véritable intérêt que s'ils peuvent être rattachés à une fonction précise de Ets1. C'est pourquoi nous nous contenterons de présenter les gènes cibles putatifs significatifs permettant d'expliquer les fonctions du facteur de transcription dans divers processus biologiques.

1. Les protéines Ets1 et l'hématopoïèse

L'hématopoïèse s'opère à partir de cellules souches communes multipotentes. L'hématopoïèse se déroule uniquement dans la moelle osseuse chez l'adulte alors qu'elle se produit dans divers organes embryonnaires les foyers para-aortiques, le sac vitellin, le foie, la rate, le thymus, la bourse de Fabricius (chez l'oiseau) et également la moelle osseuse. Les premières analyses d'expression de Ets1 (que ce soit au niveau de ses transcrits ou au niveau protéique) suggéraient son implication au cours de la différenciation des cellules sanguines. Une analyse systématique de l'expression de plusieurs membres de la famille Ets dans différentes cellules hématopoïétiques plus ou moins matures a également été réalisée, suggérant à nouveau l'implication de ces facteurs de transcription dans ce processus (Romano-Spica et al., 1994).

a) Le rôle de Ets1 dans les cellules érythroïdes et myéloïdes

L'expression de Ets1 a été détectée dans les hémangioblastes, précurseurs présomptifs de la lignée érythroïde primitive et des cellules endothéliales. Elle n'est pas détectée dans les cellules matures (Queva et al., 1993). Par contre, *in vitro*, les cellules érythroïdes de la lignée définitive et les cellules myéloïdes expriment plutôt d'autres membres de la famille Ets que Ets1 lui-même (Romano-Spica et al., 1994).

b) Le rôle de Ets1 dans les cellules lymphoïdes

Par immunoprécipitation, les protéines Ets1 ont été détectées dans des lymphocytes issus du thymus ou de la bourse de Fabricius d'embryon de poulet ou de jeunes poussins alors que les lymphocytes circulants n'expriment que très faiblement la protéine (Ghysdael et al., 1986). Des analyses précises (par identification des marqueurs de surface) des populations cellulaires composant le thymus de souris ont révélé que l'expression de Ets1 correspondait à l'apparition des thymocytes de type $CD4^+/CD8^-$ (Bhat et al., 1989) suggérant une fonction du facteur de transcription dans la différenciation des cellules T et plus particulièrement les cellules auxiliaires ou *helper* dérivées de la maturation des thymocytes $CD4^+/CD8^-$. D'autre part, lors de l'activation des lymphocytes T, la capacité de Ets1 à se lier à l'ADN est inhibée suite à une phosphorylation de la protéine suggérant son implication dans le passage à l'état activé des lymphocytes T (Rabault and Ghysdael, 1994). Cette hypothèse a été confirmée par l'effet du blocage de l'expression de Ets1 par des antisens dans des cellules T qui provoque une forte augmentation de l'expression de l'interleukine 2 habituellement présente lors de l'activation des lymphocytes (Romano-Spica et al., 1995). Plusieurs gènes cibles de Ets1 sont impliqués dans le développement des thymocytes et la maturation des cellules T comme les gènes codant les chaînes α et β des récepteurs TCR (*T-cell Receptor*) (Ho et al., 1990; Prosser et al., 1992). Finalement, l'obtention des cellules T déficientes en Ets1 a permis de préciser son rôle dans la lymphopoïèse. Des cellules ES *ets*^{-/-} ont été introduites dans un blastocyste RAG-2^{-/-} et leur capacité à se différencier en cellules B et T matures a été étudiée. Les chimères RAG-2^{-/-} Ets1^{-/-} possèdent des cellules T et B. Néanmoins, Ets1 a un effet marqué sur le développement de ces cellules. Les cellules T déficientes en Ets1 présentent, *in vitro*, un taux de mortalité par apoptose beaucoup plus élevé que les cellules T normales suggérant une fonction pour le facteur de transcription dans la survie de ces cellules (Bories et al., 1995).

Bien que l'expression de Ets1 ait été décrite *in vivo* dans les lymphocytes B de la bourse de Fabricius (Queva et al., 1993) et *in vitro* dans des cellules B (Romano-Spica et al., 1994), la fonction du facteur de transcription dans ces cellules a été peu abordée. Quelques gènes cibles pour Ets1 s'expriment dans ces cellules et notamment, l'*enhancer* μ des chaînes lourdes des immunoglobulines (Nelsen et al., 1993). Récemment, les chimères RAG-2^{-/-}, Ets1^{-/-} ont apporté des renseignements intéressants sur le rôle de Ets1 dans les cellules B (Bories et al., 1995). Si le nombre de cellules B dans ces souris n'est pas affecté par l'absence de Ets1, en revanche, leur différenciation semble perturbée puisque un taux anormalement élevé de cellules B sécrétant des

IgM a été observé au sein de la population, suggérant une intervention de Ets1 dans la différenciation des cellules B.

2. Les protéines Ets1 et les processus migratoires et invasifs

a) l'expression de ets1 au cours des processus migratoires et invasifs

Une corrélation entre l'expression de ets1 et la migration cellulaire a été observée au cours du développement normal et pathologique ou dans des modèles *in vitro*.

Dans les premiers jours de développement de l'embryon de poulet, au stade de la gastrulation, ets1 est exprimé dans les cellules mésodermiques en cours de migration (Queva et al., 1993). Plus tard, lors de la formation des bourgeons plumaires, l'expression de ets1 est détectée dans les cellules dermiques qui migrent afin de se regrouper et former ces bourgeons (Desbiens et al., 1991; Queva et al., 1993).

De plus, bien que les ARNm ets1 ne soient pas détectés dans les structures épithéliales cohésives, leur expression est induite lorsque les structures se dissocient et que les cellules d'origine épithéliales migrent. Trois cas illustrent l'induction de l'expression du facteur de transcription Ets1 au cours de ce processus qui est appelé transition épithélium-mésenchyme : lorsque la partie ventrale des somites se dissocie pour former le sclérotome ; plus tard dans le développement, lorsque des cellules épithéliales s'échappent du dermatome pour rejoindre le derme en formation ; enfin, lorsque des cellules de la crête neurale se dissocient (Fafeur et al., 1997). Cette situation a été reproduite *in vitro* avec des cellules épithéliales de rein de chien (MDCK) qui forment des îlots compacts lorsqu'elles sont cultivées en basse densité. Ces îlots se dissocient suite au traitement par le SF/HGF (*Scatter-factor/Hepatocyte Growth Factor*) ; l'expression et l'activité de Ets1 sont alors stimulées (Fafeur et al., 1997).

Le facteur de transcription Ets1 a également été associé au processus invasif lors du développement tumoral. Ainsi, dans différents carcinomes (du poumon, du sein, du colon, du pancréas et de la thyroïde), ets1 a été détecté dans les fibroblastes du stroma tumoral et plus particulièrement dans ceux qui sont situés à proximité des zones tumorales invasives (Wernert et al., 1994).

b) Des gènes cibles de ets1 impliqués dans le remodelage extra-cellulaire

Les données sur l'expression de Ets1 semblent s'accorder pour l'impliquer dans la régulation du processus invasif. Le processus invasif requiert des remodelages extra-cellulaires, la migration des cellules et une restructuration de la zone d'invasion (en somme, des étapes assez proches de

celles décrites pour le processus angiogénique). Certains des gènes cibles putatifs de Ets1 pourraient parfaitement expliquer le rôle du facteur de transcription dans l'invasion. En effet, le remodelage de la matrice extra-cellulaire indispensable au processus invasif nécessite l'intervention des protéases. Or, *in vitro*, les expressions de l'uPA (Nerlov et al., 1991; Stacey et al., 1995), de la collagénase interstitielle (Gutman and Wasylyk, 1990) et la stromélysine (Wasylyk et al., 1991) sont régulées par Ets1. Toutefois, si dans certaines conditions, ces gènes semblent être une cible pour Ets1, cette hypothèse est loin d'être applicable à tous les processus invasifs où le facteur de transcription est exprimé. Ainsi, l'uPA, la collagénase interstitielle ou la stromélysine sont exprimés dans les fibroblastes de stromas de tumeurs et leurs expressions se superposent parfois avec celles de ets1 (Wernert et al., 1994). De même, *in vitro*, l'expression de l'uPA et la collagénase interstitielle est induite dans les cellules MDCK traitées au SF/HGF parallèlement à l'expression de Ets1 et à la dissociation de ces cellules (Fafeur et al., 1997). En revanche, au cours du développement embryonnaire, il n'y a quasiment aucune corrélation entre l'expression de ets1 et celles de ces protéases suggérant une autre fonction pour ce facteur de transcription que celle de participer à la régulation de l'expression des enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire.

3. Les membres de la famille Ets1 et le développement des vaisseaux sanguins

a) L'expression des facteurs de transcription Ets et le développement des vaisseaux sanguins

Au cours de la vasculogénèse, les transcrits ets1 ont été détectés dans les îlots sanguins de la zone extra-embryonnaire. Lorsque ces îlots deviennent matures, cette expression se restreint à la périphérie de ces îlots, où se différencient les cellules endothéliales des vaisseaux en formation de cette même zone. De façon générale, on détecte l'expression de ets1 dans les parois des vaisseaux en début de leur développement, les transcrits ont été ainsi identifiés au niveau des cellules endothéliales de l'aorte qui est le premier vaisseau à se former dans l'embryon et cette expression diminue à nouveau avec la maturation du vaisseau. L'endocarde exprime également transitoirement le facteur de transcription ets1. Dans un certain nombre d'organes où la vascularisation se met en place par le processus d'angiogénèse, l'expression de Ets1 a également été observée. Ainsi, au niveau du rein ou du cerveau, les cellules endothéliales participant à la mise en place de la vascularisation expriment ets1 (Vandenbunder et al., 1989). Cette corrélation entre l'expression de ets1 et le déroulement du processus angiogénique a, de nouveau, été retrouvée dans des situations pathologiques comme l'angiogénèse tumorale (Bolon et al., 1995; Wernert et al., 1992). D'autre part, *in vitro*, l'expression de ets1 est induite dans des cellules

endothéliales humaines par plusieurs facteurs angiogéniques : les FGF-1 et -2, l'EGF, et le VEGF (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996).

Il faut noter que Ets1 n'est pas le seul membre de sa famille à être exprimé au cours du processus angiogénique. Les patrons d'expression de Erg (Dhordain et al., 1995) et Fli se superposent à celui de ets1, et notamment dans les vaisseaux sanguins au début du développement embryonnaire ; plus tard, ces patrons se différencient. Ces deux facteurs de transcription sont donc aussi des acteurs moléculaires putatifs de l'angiogenèse. De plus, la récente inactivation de Tel (un autre membre de la famille Ets) dans les souris met en évidence une fonction pour ce facteur au cours du processus angiogénique (Wang et al., 1997). On ne sait cependant pas précisément si ce membre de la famille Ets s'exprime dans les cellules endothéliales.

b) Un rôle hypothétique pour Ets1 au cours de la vasculogenèse et l'angiogenèse

Nous avons déjà évoqué une hypothétique fonction pour Ets1 au cours du processus invasif via la régulation de l'expression de divers protéases (voir précédemment). Comme le développement d'un nouveau vaisseau sanguin implique des remodelages tissulaires, des migrations cellulaires et des restructurations des matrices environnant le nouveau vaisseau, il est tentant de proposer une fonction pour Ets1 dans la régulation des gènes codant les protéases impliquées au cours de l'angiogenèse. Récemment, l'utilisation d'oligonucléotides antisens de ets1 sur des cellules endothéliales humaines a provoqué une inhibition de la migration induites par des facteurs angiogéniques des cellules. Les auteurs ont démontré que dans ces cellules, l'expression de l'uPA et de la collagénase interstitielle diminuait ce qui suggère une régulation de l'expression de ces protéases par Ets1 (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996).

Cependant, nous verrons que l'étude de l'expression de l'uPA et de la collagénase interstitielle ne permet pas de valider cette hypothèse et que la fonction de Ets1 pourrait être bien différente de celle déjà proposée.

Nous venons ici de présenter le contexte dans lequel ce travail de thèse a été réalisé. C'est donc au sein d'un processus complexe mettant en jeu de nombreux facteurs mais également de multiples interactions entre les cellules ou entre les cellules et leur environnement que nous avons tenté de rechercher la fonction du facteur de transcription ets1 au cours du développement de vaisseaux sanguins.

1^{ère} partie

Première partie :

L'expression du facteur de transcription ets1 ainsi que celle d'autres membres de sa famille a été décrite avec précision au cours du développement embryonnaire ou tumoral. Cependant, sa fonction, notamment dans le processus angiogénique, reste imprécise.

L'objectif de notre travail a été principalement centré sur la détermination d'une fonction pour les membres de la famille Ets au cours du processus angiogénique. Des expériences de transfection transitoire avaient permis d'identifier des gènes cibles putatifs de Ets1, parmi lesquels se trouvent des gènes codant des protéases dégradant la matrice extra-cellulaire. Puisque le processus angiogénique nécessite la dégradation de la matrice extra-cellulaire, il était tentant de proposer que Ets1 participait à la régulation transcriptionnelle de ces gènes au cours de l'angiogénèse. Pour justifier cette hypothèse, nous avons d'abord cherché à établir des corrélations entre l'expression de Ets1 et celles de ces gènes cibles potentiels. Nous avons décrit en particulier l'expression du gène codant la collagénase interstitielle ou MMP-1 pour la comparer à celle de Ets1 notamment au cours de l'angiogénèse. Ces travaux sont présentés dans la première publication.

Ensuite, afin de déterminer une fonction précise pour les protéines Ets dans l'angiogénèse, nous avons adopté une stratégie de travail nous permettant de perturber *in vitro* et *in vivo* les activités de ces facteurs de transcription. Pour cela, nous avons construit des vecteurs rétroviraux contrôlant l'expression d'une protéine mutante dominant négatif de Ets1 dans les cellules infectées. Les cellules endothéliales qui expriment ce mutant adhèrent plus efficacement aux protéines de la membrane basale (la laminine) et de la matrice extra-cellulaire (le collagène de type I). L'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extra-cellulaire intervenant dans la prolifération, la migration et la capacité des cellules à s'organiser, les protéines Ets pourraient jouer un rôle fondamental dans la formation des vaisseaux sanguins. Ces résultats sont présentés dans la deuxième publication.

Première publication :

L'expression de la collagénase interstitielle est restreinte au tissu squelettique au cours du développement embryonnaire de la souris.

Résumé de la publication :

Dans cette étude, l'expression de la collagénase interstitielle (ou MMP-1) a été analysée au cours de l'embryogenèse de la souris entre les stades 6 et 17 jours de développement. Par Northern blot les transcrits ont été uniquement détectés à partir de 15 jours de développement. Par hybridation *in situ*, nous avons confirmé que cette métalloprotéinase était exprimée tardivement (au stade de 15 jours de développement). Nous avons démontré qu'elle était exclusivement exprimée au cours du processus d'ossification de type endochondrale (au niveau du cartilage hypertrophié et de l'os en formation). L'inhibiteur de métalloprotéinase TIMP-2 s'exprime plus précocement au cours du développement que la métalloprotéinase (dès 13 jours de développement) et spatialement cet inhibiteur est détecté dans les zones avoisinant l'expression de la métalloprotéinase.

Expression of *interstitial collagenase* is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis

Virginie Mattot¹, Marie Berthe Raes¹, Patrick Henriët², Yves Eeckhout², Dominique Stehelin¹, Bernard Vandebunder^{1,*} and Xavier Desbiens³

¹CNRS URA 1160, Institut Pasteur, 1 rue du Professeur Calmette, 59019 Lille, France

²Laboratoire de Chimie Physiologique (Connective Tissue Group), Université de Louvain and International Institute of Cellular and Molecular Pathology, Bruxelles, Belgium

³Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire du Développement, Université des Sciences et Technologies de Lille, Villeneuve d'Ascq, France

*Author for correspondence

SUMMARY

Collagenases are thought to be involved in physiological and pathological processes that require extracellular matrix remodeling. Using the *in situ* hybridization technique, we describe the expression of *interstitial collagenase* gene during mouse embryogenesis between E6.5 and E17. We demonstrate that *interstitial collagenase* expression is exclusively detected in one event, namely the onset of bone formation. Transcripts accumulate in hypertrophied chondrocytes, found in the mature cartilaginous matrix of long-bone growth plates or ribs, and in osteoblasts and/or in endothelial cells that have migrated

into the shafts of developing long bones. The expression of the *tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2)* gene precedes the expression of *interstitial collagenase* in developing bones. These data suggest that *interstitial collagenase* plays a specific role in bone development and that the tight regulation of its activity during development is achieved not only by post-translational mechanisms with TIMPs, as previously suggested, but also at the transcriptional level.

Key words: *interstitial collagenase*, *TIMP-2*, hypertrophied chondrocyte, bone morphogenesis, embryo

INTRODUCTION

Collagen molecules, the most abundant proteins in vertebrate organisms, are structural components of the extracellular matrix. Fourteen different types of collagen have been characterized so far. They form various structures, such as fibrils found in most connective tissues and made of types I, II, III, V and XI collagen, or sheets constituting basement membranes with type IV collagen and Descemet's membrane with type VIII collagen. The sequence and structural organization of type X collagen are very similar to those of type VIII collagen. This collagen is specifically expressed in hypertrophic chondrocytes (Kirsch and von der Mark, 1990). Other less abundant collagens, types IX, XII, XIV fibril associated collagen and types VII and VI collagen, connect sheets and fibrils with other tissue components (Van Der Rest and Garrone, 1991).

Matrix metalloproteinases are zinc proteinases that degrade at least one of the different components of the extracellular matrix. The matrix metalloproteinase family is divided into three groups: collagenases with interstitial (MMP-1) and neutrophil collagenases (MMP-8); gelatinases with gelatinase A or 72 kDa gelatinase (MMP-2) and gelatinase B or 92 kDa gelatinase (MMP-9); and stromelysins with stromelysin-1 (MMP-3), stromelysin-2 (MMP-10) and matrilysin (MMP-7). Gelatinases degrade basement membrane collagens or gelatin; stromelysins

can act on several substrates including proteoglycans, type IV collagen, laminin, fibronectin and gelatin. Collagenases are the only known proteinases capable of cleaving the triple helical domain of the native fibrillar collagens, thereby generating fragments which can be degraded by gelatinolytic proteinases (Docherty and Murphy, 1990; Matrisian, 1990; Woessner, 1991). Interstitial collagenase or type I collagenase (EC 3.4.24.7; MMP-1) is secreted into the extracellular medium (Valle and Bauer, 1979) and degrades types I, II and III collagen (Welgus et al., 1981), type VII collagen or anchoring fibril (Seltzer et al., 1989), type VIII collagen (Sage, 1982) and type X collagen (Welgus et al., 1990). Interstitial collagenase, like other metalloproteinases, is made up of four domains: a signal peptide, a propeptide, a catalytic domain and a hemopexin-like domain (Henriët et al., 1992; Matrisian, 1990).

The control of extracellular proteolysis is critical for the organism. Interstitial collagenase and other metalloproteinases can be activated by proteolytic cleavage (for review see Woessner, 1991). They are also regulated by different inhibitors including the tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) (for review see Woessner, 1991). TIMP-1 is a secreted glycoprotein that forms a stoichiometric complex with collagenases, stromelysins or the proform of 92 kDa type IV collagenase/gelatinase. TIMP-2 inhibits the enzymatic activity of both 72 kDa type IV collagenase/gelatinase (Goldberg et al.,

1989; Matrisian, 1990; Stetler-Stevenson et al., 1989) and interstitial collagenase in its activated form. In addition TIMP-2 blocks the proteolytic activation of procollagenase (DeClerck et al., 1991).

The extracellular matrix is a dynamic structure which is remodeled by metalloproteinases during physiological or pathological processes. For example mouse blastocysts secrete functional matrix degrading proteinases (Brenner et al., 1989). During early morphogenesis of mouse salivary glands collagenase inhibits the initiation of the cleft formation whereas collagenase inhibitors stimulate this formation (Nakanishi et al., 1986). Metalloproteinases are also implicated in tumor invasion and metastasis (reviewed by Liotta, 1986; Matrisian, 1990) by removing the extracellular matrix out of the way of invading tumor cells, in rheumatoid arthritis and osteoarthritis by damaging articular cartilage (reviewed by Wolfe et al., 1993).

The expression of *interstitial collagenase* during embryogenesis has never been described, since specific probes were not available for such studies. In this study using a mouse *collagenase* probe (Henriet et al., 1992) we show that *interstitial collagenase* expression is first detected by northern blot analysis of total embryonic RNA on day 15 of gestation, and appears to increase thereafter.

In situ hybridization reveals that this expression is located exclusively in bone formation areas. By comparison between in situ hybridization and histological staining with Alcian Blue, we determined that *interstitial collagenase* is mainly expressed in hypertrophied chondrocytes during mouse development.

MATERIALS AND METHODS

Interstitial collagenase and TIMP-2 probes

A 2.7 kbp mouse MMP-1 cDNA (Henriet et al., 1992) was inserted between the *Hind*III and *Not*I sites of a pBluescript plasmid (Stratagene). This cDNA contains a 10 bp 5' untranslated region, a 1416 bp open reading frame, a 1215 bp 3' untranslated region containing the polyadenylation signal and a 19 bp poly(A) tail. A 997 bp fragment was prepared by *Xho*I-*Nar*I digestion to probe northern blots. The probe used to detect *TIMP-2* mRNAs was transcribed from a 791 bp fragment of a human *TIMP-2* cDNA. Since *TIMP-2* had only 41% amino acid identity until *TIMP-1* (Stetler-Stevenson et al., 1989), *TIMP-2* probe will not hybridize with *TIMP-1* transcripts under the conditions used for our in situ studies. Furthermore, the intensity of the signals detected with our *TIMP-2* probe decreased drastically from E10.5 to E17 (see Fig. 4) whereas Flenniken and Williams (1990) and Nomura et al. (1989) report that the amount of *TIMP-1* transcripts during bone formation increases until birth.

Northern blot

Embryos from Swiss strain mice were frozen in liquid nitrogen and total RNA was extracted in RNAzol (Bioprobe) according to Chomczynski and Sacchi (1987). Samples of 20 µg of total RNAs were electrophoresed in 1.2% agarose formaldehyde gel and transferred to nitro-cellulose membranes (Amersham). These membranes were hybridized at 42°C overnight with the 997 bp ³²P-nick translated mouse *interstitial collagenase* cDNA probe in the hybridization solution (formamide 50%, Denhardt 1×, Hepes, pH 7.0, 50 mM, SSC 3×, calf thymus DNA 250 µg/ml). Membranes were subsequently washed at 60°C in 2× SSC, 0.1% SDS twice during 10 minutes and exposed 6 days with an Amersham MP film.

Poly(A)⁺ RNAs were purified with oligo(dT)-cellulose columns

(mRNA purification kit; Pharmacia). Samples of 2 µg of poly(A)⁺ RNAs were used for northern blot analysis in the same conditions as used with total RNA.

Equal loading of total RNA in various lanes was assessed with a GAPDH probe.

In situ hybridization

Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 5 µm sections were collected on glass slides previously treated with 3-aminopropyltriethoxysilane (TESPA, Aldrich).

Sense and antisense [³⁵S]CTP labelled RNA probes were transcribed with T7 or T3 RNA polymerases from the pBluescript plasmids previously linearised. In situ hybridization was performed as described by Quéva et al. (1992). Since a human *TIMP-2* probe was used in these studies with mice embryos, hybridization and washes were carried out at 55°C instead of 60°C. Control sense probe hybridization never displayed signals.

Histological staining

The sections were hydrated and stained with Alcian Blue as described by Lev and Spicer (1964). They were counterstained with Nuclear Red, rinsed, dehydrated with ethanol and treated with xylene before mounting under coverslips with Xam (BDH Gurr).

RESULTS

Previous studies have shown that the size of mouse collagenase mRNA was about 3.0 kb (Henriet et al., 1992). On a northern blot of total RNA from mouse embryos the *interstitial collagenase* probe hybridized with a 3 kb mRNA species (Fig. 1). These transcripts were first detected at E15 and their amount increased thereafter.

Since the absence of hybridization signal at E13 could be due to the poor sensitivity of northern analysis, we used the in

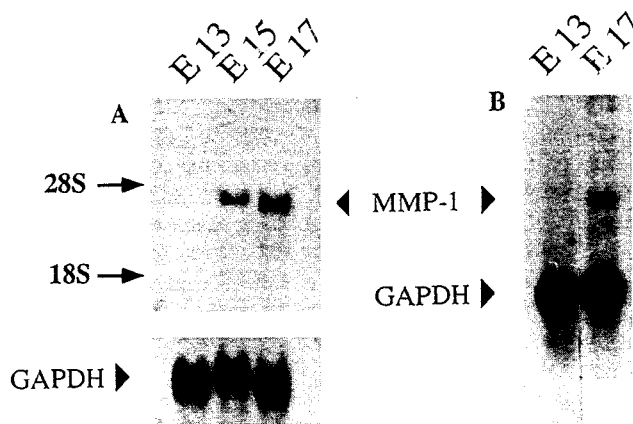


Fig. 1. (A) Northern blot analysis of total RNA from E13, E15 and E17 mouse embryos for *interstitial collagenase* expression. The filter was rehybridized with a GAPDH probe to assess the loading of the blot. The positions of ribosomal 28 S and 18 S RNA are indicated. In lanes E15 and E17, note that the difference between the migrations of the mRNAs hybridizing with the collagenase (or with the GAPDH) probe results from an artifact in the wells of the gel. (B) In order to increase the sensitivity of the assay for the early stages of development, poly(A)⁺ RNAs from E13 and E17 mouse embryos were used for northern blot analysis. This technique confirmed the absence of *interstitial collagenase* RNAs at E13.

situ hybridization technique to assess the expression of *interstitial collagenase* during the early stages of mouse development. RNA probes were transcribed from 2.7 kb templates using [^{35}S]CTP at about 1300 Ci mmol^{-1} . Assuming that 10% hybridization efficiency is achieved and that the probability of getting one silver grain from a β particle emitted by the disintegration of ^{35}S is 10% (Rogers, 1979), the sensitivity of the

detection of collagenase transcripts will be about 0.6 grain per mRNA molecule per week of exposure to the emulsion. Despite a low estimate for the hybridization efficiency this evaluation indicates that the limit of the sensitivity after a two week exposure will be about one mRNA molecule/cell. At E6.5, embryos with the surrounding maternal tissue, and at E10.5 and E13, the entire embryos, were sectioned and

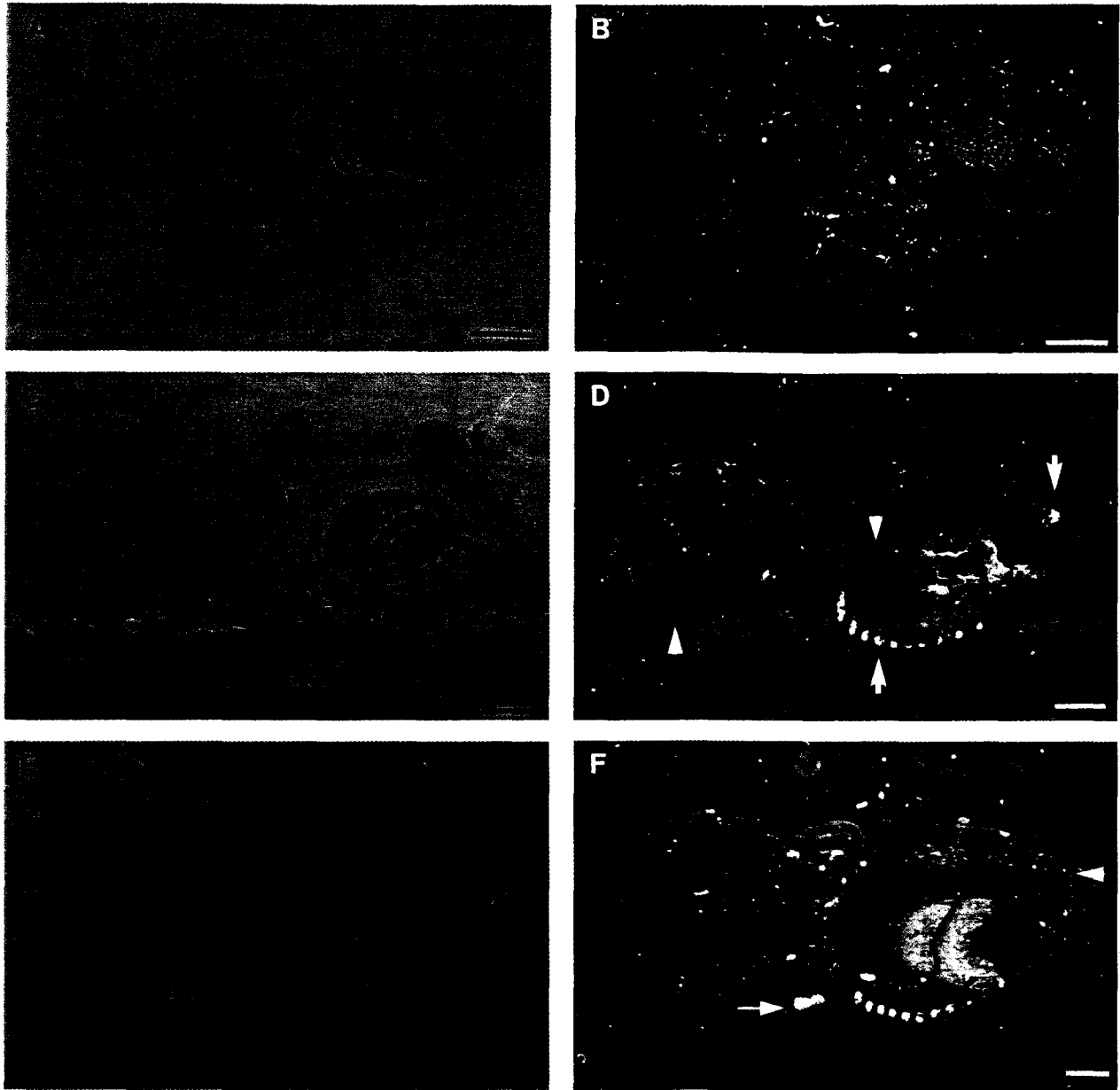


Fig. 2. In situ hybridization analysis of *interstitial collagenase* expression in mouse embryos. Alcian Blue staining (A,C,E) visualized by bright field and distribution of silver grains (B,D,F) visualized by dark field. (A-B) Sagittal sections at E13. The little arrows show cartilaginous primordia of cervical vertebrae. *interstitial collagenase* transcripts were not detected. The liver (li), at this stage as well as later during development, and the heart ventricle (ve) displayed a non specific light scattering due to the presence of erythrocytes. mx, maxillary; md, mandible. (C-D) Sagittal sections at E15. (C) According to their state of differentiation, young chondroblasts (e.g. in ventral ribs or in future cranial bones, arrowheads) displayed large amounts of matrix and consequently were strongly stained. In contrast, hypertrophied chondrocytes (e.g. in dorsal ribs or in femur; arrows) were faintly stained. (D) Only the cells of the mature cartilaginous matrix expressed *interstitial collagenase* (arrows). lu, lung. (E-F) sagittal sections at E17. The cartilaginous matrix was stained in ribs, in caudal vertebrae (arrowheads), in scapula (arrow), in mandibles and in nasal and cervical bones. *interstitial collagenase* expression was detected in the mature cartilaginous matrix cells of the scapula (arrow) and of the dorsal ribs whereas cells found in immature cartilaginous matrix were negative (e.g. caudal vertebrae, arrowhead). Bar, 1 mm.

hybridized with the *interstitial collagenase* probe. No hybridization signal was detected (Fig. 2B), suggesting that the *interstitial collagenase* gene was not expressed at these stages.

We subsequently attempted to identify the cells where this gene was expressed at later stages of development. In view of the detection of collagenase activity during bone morphogenesis (Eeckhout et al., 1986), sections were stained with Alcian Blue to visualize cartilaginous matrix accumulation within the developing skeletal tissue. Interestingly, at E13 the primordium of cervical vertebrae was stained, indicating the cartilaginous matrix deposition in these skeletal tissues where no *interstitial collagenase* transcripts were detected (compare Fig. 2A and B).

At E15, an intense hybridization signal with the *interstitial collagenase* probe was conspicuous in the dorsal ribs, in the femur and in the clavicle area (Fig. 2D). No signal was detected in the ventral ribs or elsewhere in the embryo, in the lung, in the liver or in the brain, for example. As shown with the Alcian Blue staining, at E15 the maturation of cartilaginous matrix was obvious: dorsal ribs displayed hypertrophied chondrocytes within a faint Alcian Blue staining whereas younger chondrocytes were found in the humerus head (Fig. 2C). The *interstitial collagenase* signal was localized in hypertrophied chon-

drocytes while immature cartilaginous matrix in cranial cartilaginous primordia, humerus head, tibia, fibula and metacarpals (Fig. 2C) were negative.

At E17, collagenase mRNAs were detected in the dorsal ribs, as observed at E15, but also in the lower jaw in the central part of Meckel's cartilage, in a narrow band of the dorsal part of the scapula (Fig. 2F) and in the cervical vertebrae (data not shown). Alcian Blue staining demonstrated again that this expression was restricted to hypertrophied chondrocytes while immature chondrocytes (e.g. in caudal vertebrae) were negative (Fig. 2E). *interstitial collagenase* transcripts were never localized in vascular, nervous or urogenital systems, or in the gut and its derivatives.

In order to determine if *interstitial collagenase* might be expressed in other cell types during bone morphogenesis, we analysed its expression in E18 forelimb long bones. In sagittal sections of long bones, all steps of the cartilaginous maturation during endochondral ossification can be identified (Fig. 3A and C). In the humerus, *interstitial collagenase* transcripts were detected not only in hypertrophied chondrocytes but also in bone areas in the shaft where osteoblasts, endothelial cells and probably also osteoclasts had migrated (Fig. 3B and D).

Therefore it appeared that *interstitial collagenase* was exclu-

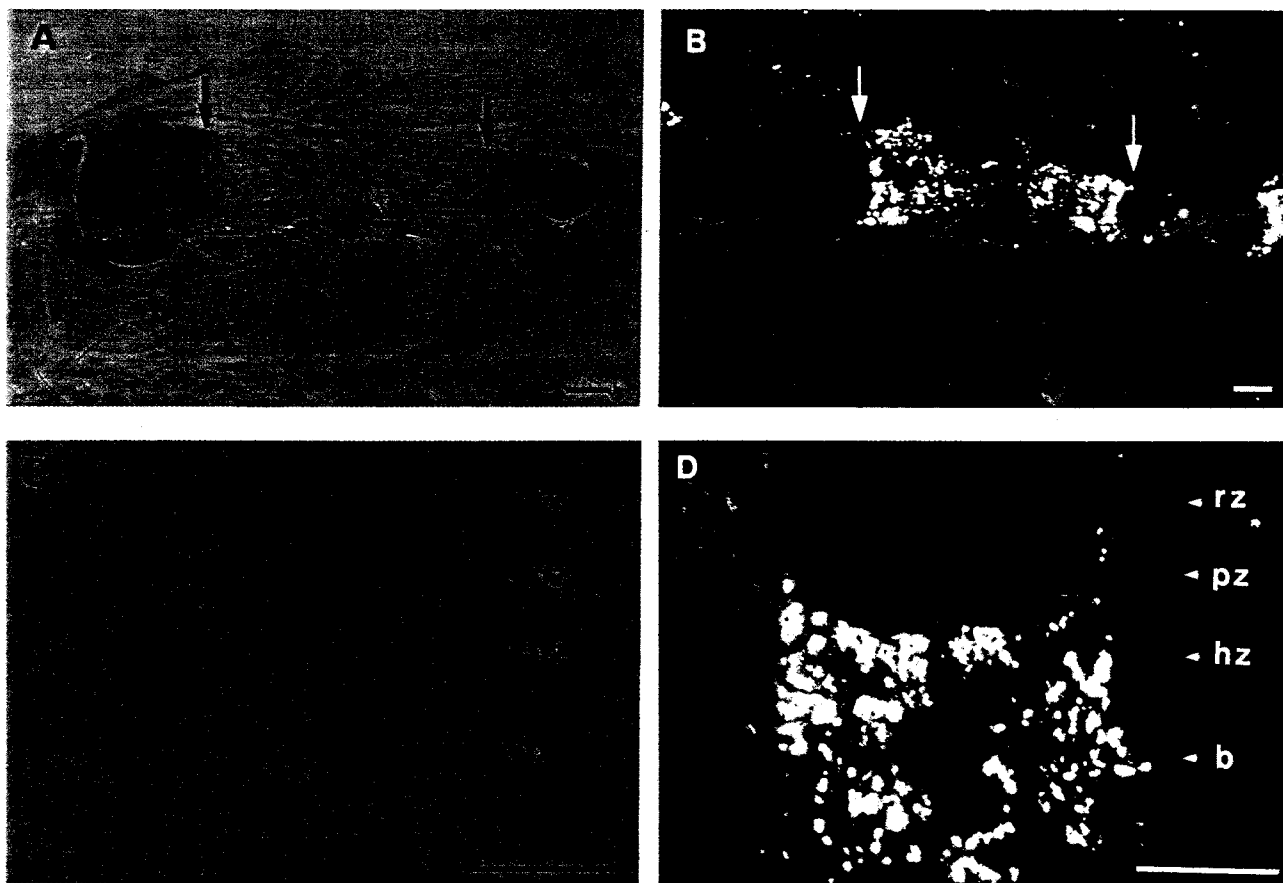


Fig. 3. In situ hybridization analysis of *interstitial collagenase* expression in the humerus at E18. Alcian Blue staining (A,C) and distribution of silver grains (B,D). (A-B) The epiphysis staining corresponds to the cartilaginous matrix; between the arrows are the growth plate and the forming bone. *interstitial collagenase* expression was detected in the growth plate and in the bone up to the middle of the shaft. (C-D) In the growth plate the resting zone (rz), proliferating zone (pz), hypertrophic zone (hz) and forming bone (b) can be easily identified after Alcian Blue staining. *interstitial collagenase* gene expression began to be detected in hypertrophied chondrocytes of the hypertrophic zone (hz) and remained high in the forming bone (b) where endothelial cells, future osteoblasts and probably osteoclasts were migrating. Bar, 300 μ m.

expressed at the onset of bone formation during mouse development. It was of interest to see how this expression correlated with that of metalloproteinase inhibitors. In contrast to *interstitial collagenase*, *TIMP-2* expression had already occurred at E13. *TIMP-2* transcripts were detected at the periphery of the dorsal ribs of mouse embryos (Fig. 4) whereas *interstitial collagenase* transcripts were found only at E15 and inside the ribs (Fig. 2). *TIMP-2* transcripts were expressed in large areas around the dorsal ribs at E13 and the amount of transcripts decreased thereafter (Fig. 4). This expression was closely restricted to the rib periphery at E17 (Fig. 4E).

DISCUSSION

Since interstitial collagenase is able to degrade different collagen molecules (types I, II, III, VII, VIII and X), its expression could have been expected in a variety of tissues in the mouse embryo. Interestingly, however, our *in situ* hybridization analysis revealed a restricted expression of *interstitial collagenase* mRNAs within developing bones suggesting that uncontrolled collagenase activity may represent a danger for

the integrity of the embryo. At E6.5, during mouse embryo implantation in the uterine wall, *interstitial collagenase* transcripts were never detected. This result indicates that *interstitial collagenase* is not involved during mouse embryo implantation; at that time urokinase-type plasminogen activator (uPA) transcripts are expressed in invading embryonic tissues (Grevin et al., 1993; Sappino et al., 1989) whereas they are not detected in the embryo proper until E10.5.

The absence of *interstitial collagenase* expression outside the developing bones in embryos is in sharp contrast to its conspicuous expression in adult tissues under pathological conditions, in stromal fibroblasts of colonic neoplasia (Gray et al., 1993), oral squamous cell carcinoma (Gray et al., 1992), breast carcinoma (Polette et al., 1993) and other invasive carcinomas (Wernert et al., in the press), and also in keratinocytes and epithelial cells in cutaneous wound repair after burn injury (Stricklin et al., 1993). This indicates that the remodeling of the extracellular matrix during invasive processes requires different proteases in the embryo and in tumors.

The comparison between our *in situ* hybridization and histological staining results demonstrates that *interstitial collagenase* is mainly expressed in hypertrophied chondrocytes.

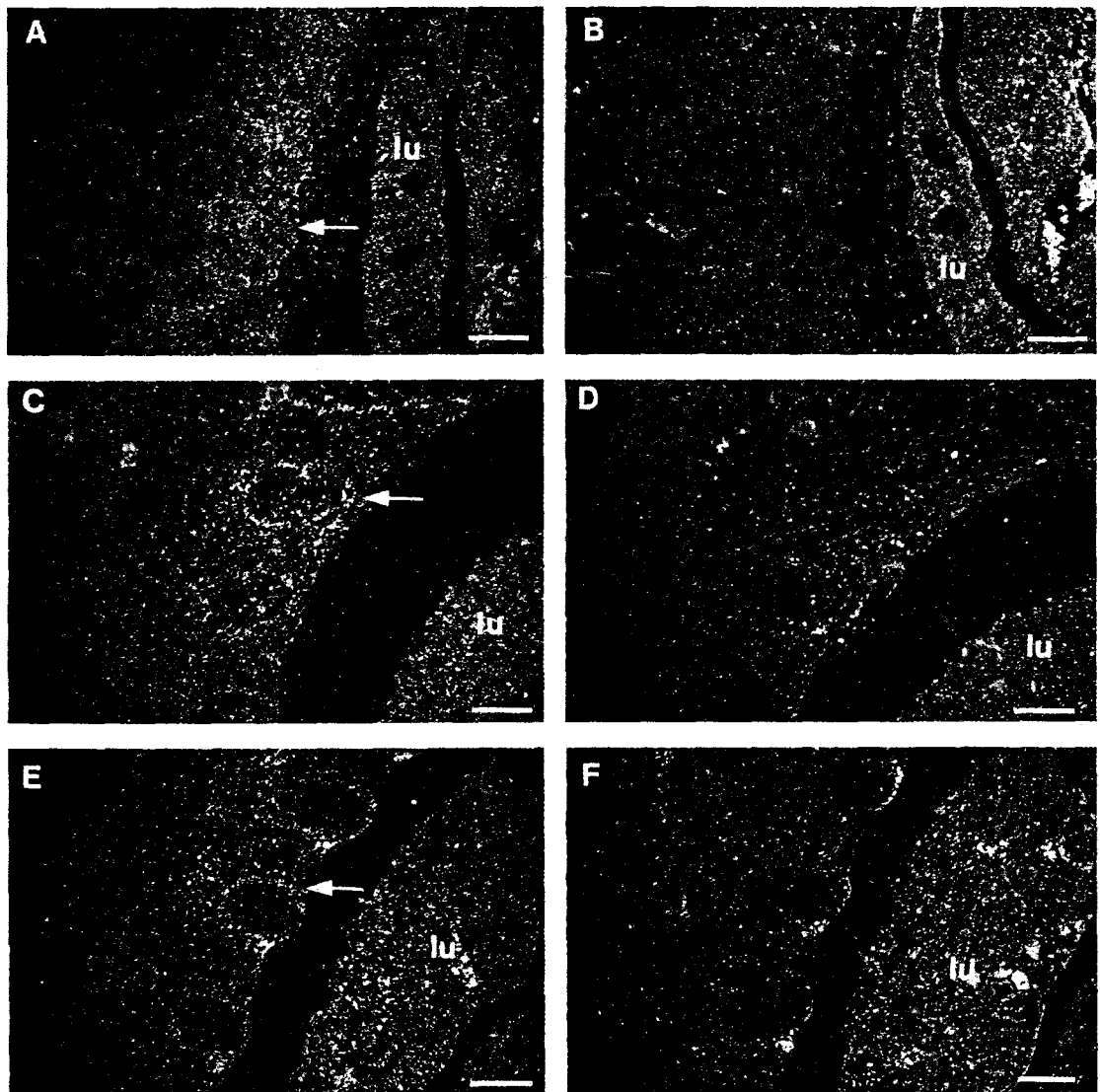


Fig. 4. *In situ* hybridization analysis of *TIMP-2* expression around the dorsal ribs. Hybridization with the antisense (A,C,E) or the sense (B,D,F) *TIMP-2* cDNA probe. *TIMP-2* transcripts were detected at the periphery of the dorsal ribs (arrows) in the mouse embryo at E13 (A-B), at E15 (C-D) as well as at E17 (E-F). The intensity of the signal decreases upon development. lu, lung. Bar, 200 μ m.

The cartilaginous matrix of the future bones appears at about E13. Endochondral ossification occurs from this cartilaginous matrix (Kaufman, 1992). During this process proliferating chondrocytes in the cartilaginous growth plate differentiate into hypertrophied chondrocytes (reviewed by Farnum and Wilsman, 1987) and the surrounding cartilaginous matrix is extensively remodelled. Therefore the localization of *interstitial collagenase* RNA in hypertrophied chondrocytes is not surprising. Moreover, other studies have shown the involvement of collagenase in bone morphogenesis. Collagenase activity was detected in sections of the growth plate containing hypertrophied chondrocytes from rats developing a rachitic syndrome upon treatment with bisphosphonate (Dean et al., 1989). Metalloproteinases including collagenase were detected by immunolocalization, not only in hypertrophied chondrocytes but also in the chondrocytes of the resting and proliferating zones in femur growth plates dissected from newborn rabbits (Brown et al., 1989). In the mouse embryo forelimb at E18, we show here that *interstitial collagenase* gene expression is not restricted to hypertrophied chondrocytes of the growth plate; *interstitial collagenase* was also expressed in the shaft where osteoblasts, endothelial cells and probably osteoclasts migrate to form the final bones. This result is consistent with the observations of Cole et al. (1993) who suggested that bone or marrow cells release active collagenase after the complete degradation of the cartilage in cultured chick embryo tibia. Moreover, osteoblasts (Heath et al., 1984), osteoclasts (Delaissé et al., 1993) and endothelial cells (Herron et al., 1986; M. B. Raes, unpublished results) are able to express and secrete collagenase.

Interstitial collagenase activity is regulated by both TIMP-1 and TIMP-2. Furthermore TIMP-2 may be able to block the autoproteolytic activation of interstitial collagenase (DeClerck et al., 1991). At E13.5, *TIMP-1* transcripts have been detected in the mandible and in the clavicle, around the ribs and the femurs of mouse embryos (Flenniken and Williams, 1990; Nomura et al., 1989) and TIMP-1 has been localized in rabbit growth plate chondrocytes (Brown et al., 1989). We also detected *TIMP-2* transcripts at E13 in bone formation areas including at the periphery of dorsal ribs. Therefore both *TIMP-1* and *TIMP-2* transcripts are expressed before the onset of *interstitial collagenase* gene expression and their presence thereafter makes it likely that TIMP-1 and TIMP-2 take part in a security mechanism preventing the dissemination of active collagenase molecules.

The tight regulation of interstitial collagenase activity during development seems to be achieved not only by post-translational mechanisms, as previously suggested, but also at the transcriptional level. The activity of the *collagenase* gene promoter has been shown to be regulated by *c-Fos/c-Jun* (AP1) complexes and by *Ets* (PEA3) transcription factors (Gutman and Wasylyk, 1990; Wasylyk and Wasylyk, 1992; reviewed by Mauviel, 1993; Woessner, 1991). *c-fos* and *c-jun* expression during mouse development has been previously described. *c-fos* transcripts were detected in the perichondrium enclosing the extremities of E17 fetal long bones (Dony and Gruss, 1987) and *c-jun* transcripts were found in cartilaginous and perichondrial cells in ribs and limbs at E14.5 (Wilkinson et al., 1989). In addition, *c-fos* overexpression induces bone tumors in transgenic mice (Rüther et al., 1989) and targeted disruption of this gene by homologous recombination generates bone

defects in homozygous mutants (Wang et al., 1992). In contrast *c-ets1* transcripts were not expressed in hypertrophied chondrocytes at E17 where *interstitial collagenase* transcripts accumulated (data not shown). In view of the expression pattern of *interstitial collagenase* described in this paper, the features of *c-fos* and *c-jun* expression suggest that *c-fos/c-jun* AP1 complexes might be involved in *interstitial collagenase* gene regulation during bone morphogenesis. However, the expression of *c-fos* and *c-jun* is not restricted to this process since *c-fos* is also detected in the outer spongiotrophoblast of the 13-day murine placenta and *c-jun* in developing muscle or in the nervous system (Dony and Gruss, 1987; Wilkinson et al., 1989), for example. Therefore, it is likely that transcription factors distinct from AP1 are involved in the specific activation of *interstitial collagenase* gene transcription during mouse skeletal development, and/or in the inhibition of this transcription in other tissues.

We thank Dr Stetler-Stevenson for the gift of the human *TIMP-2* cDNA, N. Devassine and M. A. Caillot for patient typing. This work was supported by the Institut Pasteur de Lille and the Centre National de la Recherche Scientifique, and by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte Contre le Cancer, the Fund for Medical Scientific Research (Belgium) to Y.E.; and the Belgian State, Prime Minister's Office, Science Policy Programming (Interuniversity Poles of Attraction) to the I.C.P.; P. Henriot was a Research fellow of the I.R.S.I.A. and V. Mattot is the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappoiee, D. A., Pedersen, R. A. and Werb, Z. (1989). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**, 848-859.
- Brown, C. C., Hembry, R. M. and Reynolds, J. J. (1989). Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Jt Surg.* **71-A**, 580-593.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Cole, A. A., Boyd, T., Luchene, L., Kuettner, K. E. and Schmid, T. M. (1993). Type X collagen degradation in long-term serum-free culture of the embryonic chick tibia following production of active collagenase and gelatinase. *Dev. Biol.* **159**, 528-534.
- Dean, D. D., Muniz, O. E. and Howell, D. S. (1989). Association of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) with hypertrophic cell enlargement in the growth plate. *Matrix* **9**, 366-375.
- DeClerck, Y. A., Yean, T. D., Lu, H. S., Ting, J. and Langley, K. E. (1991). Inhibition of autoproteolytic activation of interstitial procollagenase by recombinant metalloproteinase inhibitor MI/TIMP-2. *J. Biol. Chem.* **266**, 3893-3899.
- Delaissé, J. M., Eeckhout, Y., Neff, L., François-Gillet, C., Henriot, P., Su, Y., Vaes, G. and Baron, R. (1993). (Pro)collagenase (matrix metalloproteinase-1) is present in rodent osteoclasts and in the underlying bone-resorbing compartment. *J. Cell Sci.* **106**, 1071-1082.
- Docherty, A. J. P. and Murphy, G. (1990). The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann. Rheum. Dis.* **49**, 469-479.
- Dony, C. and Gruss, P. (1987). Proto-oncogene *c-fos* expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature* **328**, 711-714.
- Eeckhout, Y., Delaissé, J. M. and Vaes, G. (1986). Direct extraction and assay of bone tissue collagenase and its relation to parathyroid-hormone-induced bone resorption. *Biochem. J.* **239**, 793-796.
- Farnum, C. E. and Wilsman, N. J. (1987). Morphologic stages of the terminal hypertrophic chondrocyte of growth plate cartilage. *Anat. Rec.* **219**, 221-232.

- Flenniken, A. M. and Williams, B. R. G.** (1990). Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-lacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev.* **4**, 1094-1106.
- Goldberg, G. I., Marmer, B. L., Grant, G. A., Elisen, A. Z., Wilhelm, S. and He, C.** (1989). Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteinases designated TIMP-2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**, 8207-8211.
- Gray, S. T., Wilkins, R. J. and Yun, K.** (1992). Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **141**, 301-306.
- Gray, S. T., Yun, K., Motoori, T. and Kuys, Y. M.** (1993). Interstitial collagenase gene expression in colonic neoplasia. *Am. J. Pathol.* **143**, 663-671.
- Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandenbunder, B. and Desbiens, X.** (1993). Involvement of the proto-oncogene c-ets-1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentalation. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 519-529.
- Gutman, A. and Wasylyk, B.** (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *EMBO J.* **9**, 2241-2246.
- Heath, J. K., Atkinson, S. J., Meikle, M. C. and Reynolds, J. J.** (1984). Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone-resorbing agents. *Biochim. Biophys. Acta* **802**, 151-154.
- Henriet, P., Rousseau, G. G. and Eeckhout, Y.** (1992). Cloning and sequencing of mouse collagenase cDNA: Divergence of mouse and rat collagenases from the other mammalian collagenases. *FEBS Lett.* **310**, 175-178.
- Herron, G. S., Banda, M. J., Clark, E. J., Gavrilovic, J. and Werb, Z.** (1986). Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. *J. Biol. Chem.* **261**, 2814-2818.
- Kaufman, M. H.** (1992). *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, London.
- Kirsch, T. and von der Mark, K.** (1990). Isolation of bovine type X collagen and immunolocalization in growth-plate cartilage. *Biochem. J.* **265**, 453-459.
- Lev, R. and Spicer, S. S.** (1964). Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 309-319.
- Liotta, L. A.** (1986). Tumor invasion and metastases. Role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* **46**, 1-7.
- Matrisian, L. M.** (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* **6**, 121-125.
- Mauviel, A.** (1993). Cytokine regulation of Metalloproteinase gene expression. *J. Cell. Biochem.* **53**, 288-295.
- Nakanishi, Y., Sugiura, F., Kishi, J. I. and Hayakawa, T.** (1986). Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. *Dev. Biol.* **113**, 201-206.
- Nomura, S., Hogan, B. L. M., Wills, A. J., Heath, J. H. and Edwards, D. R.** (1989). Developmental expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) RNA. *Development* **105**, 575-583.
- Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girod de Bentzmann, S., Murphy, G. and Birembaut, P.** (1993). Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invas. Metast.* **13**, 31-37.
- Quéva, C., Ness, S. A., Graf, T., Vandenbunder, B. and Stéhelin, D.** (1992). Expression patterns of c-myc and of v-myc induced myeloid-1 (mim-1) gene during the development of the chick embryo. *Development* **114**, 125-133.
- Rogers, A. W.** (1979). *Techniques of Autoradiography*. Amsterdam, New York, Oxford, Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
- Rüther, U., Komitowski, D., Schubert, F. R. and Wagner, E. F.** (1989). c-fos expression induces bone tumors in transgenic mice. *Oncogene* **4**, 861-865.
- Sage, H.** (1982). Collagens of basement membrane. *J. Invest. Dermatol.* **79** Suppl.1, 51s-59s.
- Sappino, A. P., Huarte, J., Belin, D. and Vassalli, J.** (1989). Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *J. Cell Biol.* **109**, 2471-2479.
- Seltzer, J. L., Eisen, A. Z., Bauer, E. A., Morris, N. P., Glanville, R. W. and Burgeson, R. E.** (1989). Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin. *J. Biol. Chem.* **264**, 3822-3826.
- Stetler-Stevenson, W. G., Krutzsch, H. C. and Liotta, L. A.** (1989). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-2): A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J. Biol. Chem.* **264**, 17374-17378.
- Stricklin, G. P., Li, L., Jancic, V., Wenczak, B. A. and Nanney, L. B.** (1993). Localization of mRNAs representing collagenase and TIMP in sections of healing human burn wounds. *Am. J. Pathol.* **143**, 1657-1666.
- Valle, K. J. and Bauer, E. A.** (1979). Biosynthesis of collagenase by human skin fibroblasts in monolayer culture. *J. Biol. Chem.* **254**, 10115-10122.
- Van Der Rest, M. and Garrone, R.** (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J.* **5**, 2814-2823.
- Wang, Z. Q., Ovitt, C., Grigoriadis, A. E., Möhle-Steinlein, U., Rüther, U. and Wagner, E. F.** (1992). Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos. *Nature* **360**, 741-745.
- Wasylyk, C. and Wasylyk, B.** (1992). Oncogenic activation alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth Differ.* **3**, 617-625.
- Welgus, H. G., Jeffrey, J. J. and Eisen, A. Z.** (1981). The collagen substrate specificity of human skin fibroblast collagenase. *J. Biol. Chem.* **256**, 9511-9515.
- Welgus, H. G., Fliszar, C. J., Seltzer, J. L., Schmid, T. M. and Jeffrey, J. J.** (1990). Differential susceptibility of type X collagen to cleavage by two mammalian interstitial collagenases and 72-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* **265**, 13521-13527.
- Wilkinson, D., Bhatt, S., Ryseck, R. and Bravo, R.** (1989). Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development* **106**, 465-471.
- Woessner, J. F.** (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**, 2145-2154.
- Wolfe, G. C., MacNaul, K. L., Buechel, F. F., McDonnell, J., Hoerner, L. A., Lark, M. W., Moore, V. L. and Hutchinson, N. I.** (1993). Differential in vivo expression of collagenase messenger RNA in synovium and cartilage. Quantitative comparison with stromelysin messenger RNA levels in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients and in two animal models of acute inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum.* **36**, 1540-1547.

(Received 2 May 1994 - Accepted 10 October 1994)

Discussion :

Que ce soit par Northern blot ou par hybridation in situ, l'expression de la collagénase interstitielle n'est pas détectée avant 15 jours de développement embryonnaire chez la souris. De plus cette expression est restreinte au développement osseux et ne s'observe jamais dans d'autres tissus.

1. Une expression tardive et restreinte de la collagénase interstitielle (MMP-1) au cours du développement

Durant le développement embryonnaire, de nombreux remaniements de la matrice extra-cellulaire sont requis (Matrisian, 1990). Citons comme exemple l'implantation de l'embryon dans la paroi utérine où la gélatinase de 72 kDa, la stromélysine (Brenner et al., 1989) ainsi que l'uPA (au niveau des cellules trophoblastiques envahissant la paroi utérine, (Grevin et al., 1993) ont été détectés. Parallèlement, TIMP-1, un inhibiteur de métalloprotéinases, s'exprime au cours de l'implantation suggérant un contrôle rigoureux de la dégradation de la matrice extra-cellulaire. Plus tard dans le développement, les remaniements de la matrice extra-cellulaire sont également nombreux dans les différents processus morphogénétiques et font de nouveau appel aux activités protéolytiques des métalloprotéinases. L'activité de collagénases a ainsi été clairement démontrée au cours de la morphogénèse des glandes salivaires de souris qui en culture *ex vivo* n'évoluent pas normalement en présence d'inhibiteurs de collagénases (Nakanishi et al., 1986). Dès lors, il apparaît très surprenant que la collagénase interstitielle soit exclusivement impliquée dans la formation osseuse. D'autant plus que plusieurs collagènes (de type I, II, III, VII, VIII et X) sont dégradés par la collagénase interstitielle suggérant de multiples sites d'activité possibles pour cette protéase. Toutefois, les gélatinases et les stromélysines (retrouvées par exemple lors de l'implantation embryonnaire) dégradent des substrats beaucoup plus variés que la collagénase interstitielle. Les gélatinases sont responsables de la dégradation du collagène de type IV, mais également des collagènes I, V, VII, X ainsi que de la gélatine et de la fibronectine. Les substrats des stromélysines sont tout aussi variés (fibronectine, laminine, élastine, protéoglycannes et les collagènes de type IV, V, VIII et IX) (revue Mignatti and Rifkin, 1996). La localisation spatio-temporelle restreinte de la collagénase interstitielle pourrait être le reflet de son activité protéolytique plus limitée.

Cette restriction de l'expression de la collagénase interstitielle au cours du développement de l'embryon est d'autant plus surprenante qu'elle ne reflète pas du tout la diversité d'expression observée dans des situations pathologiques. Dans des néoplasies (Gray et al., 1993), dans divers carcinomes (Gray et al., 1992; Polette et al., 1993; Wernert et al., 1994) et dans des blessures

suite à des brûlures, la collagénase interstitielle a été détectée. Il semble donc que le remaniement de la matrice extra-cellulaire dans le développement normal ou lors de situations pathologiques fasse appel à des protéases différentes.

2. Une activité protéolytique soumise à un contrôle strict

Régulièrement, l'expression d'inhibiteurs de protéases est assez fidèlement associée à celle des enzymes dégradant la matrice extra-cellulaire. Il en est de même pour l'expression de la collagénase interstitielle. Des travaux précédents avaient déjà démontré l'expression de TIMP-1 à proximité des zones d'ossification (les mandibules, la clavicule, autour du fémur et des côtes, (Flenniken and Williams, 1990; Nomura et al., 1989) et dans les chondrocytes du cartilage de conjugaison de rat (Brown et al., 1989). Nos résultats complètent ces données en mettant également en évidence la présence de TIMP-2 à proximité des zones d'ossification où s'exprime la collagénase interstitielle. Le contrôle de l'activité protéolytique apparaît ainsi particulièrement rigoureux et la présence des deux inhibiteurs semble requise suggérant une fonction spécifique pour chacun d'eux. Plus tard dans le développement, les patrons d'expression de TIMP-1 et TIMP-2 diffèrent et notamment au niveau des zones d'ossification où l'expression de TIMP-2 décline alors que celle de TIMP-1 reste élevée. Cette différence d'expression renforce le fait que chaque inhibiteur a sa fonction spécifique puisqu'il semble que leur activité soit requise différemment dans la suite du développement embryonnaire de l'os.

3. Des hypothèses sur la régulation transcriptionnelle de la collagénase interstitielle

Notre intérêt pour l'étude de l'expression de la collagénase interstitielle au cours du développement embryonnaire dépendait principalement de son éventuelle régulation par le facteur de transcription Ets1. Les résultats obtenus nous ont dissuadé de poursuivre les investigations sur le rôle de Ets1 dans la régulation de la dégradation de la matrice extra-cellulaire tout du moins au cours du processus angiogénique. D'autant plus que d'autres travaux démontraient également une absence de corrélation entre l'expression de ets1 et celle de protéases au cours du processus angiogénique. Ainsi, l'uPA n'avait pas non plus été détecté dans les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire (Grevin et al., 1993; Sappino et al., 1991), pas plus que dans les cellules endothéliales de tumeurs (Wernert et al., 1994) où s'exprime le facteur de transcription. Et il en était de même pour la collagénase interstitielle et la stromélysine dans les tumeurs (Wernert et al., 1994). Si nous avons abandonné le modèle impliquant Ets1 dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire au cours du processus

angiogénique, il n'en reste pas moins valable dans d'autres situations et citons notamment les fibroblastes du stroma tumoral où d'intéressantes corrélations d'expressions ont été obtenues (Wernert et al., 1994). Ces fonctions diverses proposées pour le même facteur de transcription dans des contextes cellulaires différents soulignent l'importance de ses partenaires potentiels variables d'un type cellulaire à l'autre.

In vitro, l'activité du promoteur de la collagénase interstitielle est régulée par le complexe AP-1 (cFos/cJun) et par des facteurs de transcription de la famille Ets (Gutman and Wasylyk, 1990; Wasylyk and Wasylyk, 1992). Si l'implication de Ets1 semble peu probable dans la régulation transcriptionnelle de la collagénase interstitielle, d'autres facteurs de transcription restent néanmoins de sérieux candidats. Les analyses de cfos et cjun au cours du développement embryonnaire sont en faveur de leur implication dans la régulation transcriptionnelle de cette protéase (Dony and Gruss, 1987; Wilkinson et al., 1989). Toutefois, l'expression ubiquitaire de cfos et cjun au cours du développement embryonnaire suggère qu'ils ne sont pas capables à eux seuls d'induire spécifiquement la transcription de la métalloprotéinase dans les formations osseuses. A ce propos, il est intéressant de noter qu'une coopération entre Erg (un membre de la famille Ets) et le complexe AP1 est nécessaire pour induire *in vitro* l'activité du promoteur de la collagénase interstitielle (Buttice et al., 1996). Cette implication de Erg dans l'activation du promoteur de la collagénase interstitielle est d'autant plus intéressante que le facteur de transcription s'exprime au cours du développement embryonnaire du poulet dans les formations cartilagineuses où le développement de l'os va se produire (Dhordain et al., 1995).

Deuxième publication :

L'expression constitutive d'une protéine mutante de Ets1 restreinte au domaine de fixation à l'ADN augmente les capacités d'adhérence et d'étalement des cellules endothéliales et altère leur organisation en structure de type capillaire sur Matrigel.

Résumé de la publication :

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet d'une protéine mutante dominant négatif pour les membres de la famille Ets, dans des cellules endothéliales de capillaire du cerveau isolées de souris transgéniques chez qui l'expression de l'antigène large T de SV40 est dépendante de la température et dans des cellules d'aorte de souris.

Nous avons d'abord déterminé les propriétés de ce mutant et notamment sa fixation à l'ADN et son pouvoir inhibiteur dans des tests de transactivation. Nous avons ensuite montré que les rétrovirus construits étaient des vecteurs efficaces pour l'infection des cellules endothéliales et que la protéine mutante s'exprimait et était fonctionnelle dans les cellules infectées.

In vitro, la prolifération des cellules exprimant ce mutant n'est pas affectée alors que leur morphologie est particulièrement perturbée puisque les cellules s'étaient fortement sur leur support après infection. Des études plus approfondies nous ont permis de montrer que les cellules endothéliales exprimant le dominant négatif adhéraient plus efficacement sur la laminine et le collagène de type I et que leur cytosquelette était désorganisé. Enfin, en accord avec leur adhérence accrue, les cellules endothéliales restent ancrées au Matrigel dans un test d'angiogenèse *in vitro*, perturbant ainsi leur capacité à former des pseudo-capillaires.

Title:

Constitutive expression of the DNA-binding domain of Ets1 increases endothelial cell adhesion and spreading and impairs the formation of capillary-like structures on Matrigel.

Authors: **MATTOT Virginie, VERCAMER Chantal, CALMELS Thierry, HUGUET Christelle, SONCIN Fabrice, FAFEUR Véronique and VANDENBUNDER Bernard .**

¹ CNRS EP560 - Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille. France.

The present address of Thierry CALMELS is : SmithKline Beecham, laboratoires pharmaceutiques, 4 rue du Chesnay Beauregard, BP 58, 35762, Saint Grégoire, France, and the present address of Christelle HUGUET is : Pfizer Limited, Discovery Biology Department, Sandwich, Kent CT13 9NJ, England.

² Supported by the CNRS, Institut Pasteur de Lille, Association pour la Recherche contre le Cancer, Ligue Nationale contre le Cancer, and the Association for International Cancer Research. V.M. was a recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur and from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

³Corresponding Author : Bernard VANDENBUNDER, CNRS EP560 - Institut Pasteur de Lille, Institut de Biologie de Lille, 1 rue Calmette, 59021 Lille. France. Tel : 33 3 20 87 10 90, fax : 33 3 20 87 11 11, e-mail : vdbunder@infobiogen.fr

Keywords: Ets transcription factor, endothelial cells, adhesion, focal contact, *in vitro* angiogenesis.

ABSTRACT

Angiogenesis is a multi-step process involving basement membrane and extracellular matrix degradation, endothelial cell migration and proliferation, and capillary morphogenesis. The transcription factor Ets1 is expressed in endothelial cells during angiogenesis in embryos and in tumors. To determine the function of Ets1 and Ets family members during this process, the DNA binding domain of Ets1 was expressed in endothelial cells after infection with a replication defective MFG recombinant retrovirus. This truncated protein had all the properties of a dominant negative mutant since it recognized the consensus sequence GGAA/T in electromobility shift assays and inhibited the transcriptional activity of Ets family members in transactivation tests performed in endothelial cells.

This Ets1 dominant negative mutant did not affect the proliferation or migration of mouse brain capillary endothelial cells (LIBE cells) or mouse aorta endothelial cells (MAE cells). Rather it induced changes in cell morphology and cytoskeleton organisation, and increased their ability to adhere on basement membrane (laminin) or extracellular matrix (type I collagen) components. As a result of this increased adhesion, their ability to form capillary-like structures onto Matrigel was impaired.

We hypothesize a function for Ets family members in the regulation of adhesion properties of endothelial cells during angiogenesis.

INTRODUCTION

Angiogenesis, the formation of new capillaries from pre-existing blood vessels occurs during both physiological (embryogenesis, menstruation, wound healing) and pathological conditions (tumour development, atherosclerosis, diabetic retinopathy). Three steps can describe this process : 1) the degradation of the pre-existing vessel basement membrane; 2) the migration and proliferation of endothelial cells; 3) cell differentiation to form a functional capillary ¹. These primary capillaries may then differentiate and mature into microvasculature or large blood vessels, with specific structures and functions. A variety of factors are implicated in the angiogenic process, including angiogenic factors, such as VEGF, FGF-1 and FGF-2, endothelial cell surface receptors, such as Flt1, Flk-1, Tie1 and Tek, matrix degrading proteases, such as urokinase-type plasminogen activator (u-PA), collagenases and stromelysin, and adhesion molecules, such as laminin, α V β 3 integrin and VE-cadherin ²⁻⁴. On the other hand the molecular mechanisms regulating the expression and activity of these factors are still poorly understood. In particular, the identification of transcription factors controlling gene expression during angiogenesis remains an important task ³.

Ets1 is the cellular counterpart of the v-ets oncogene found in the genome of the avian leukemia retrovirus E26 ^{5,6}. Ets1 encodes a transcription factor which is the founder of a family containing more than 30 related proteins. Members of the Ets family share a well-conserved 85 amino acids sequence, named the Ets domain, which corresponds to the DNA-binding domain ^{7,8}. Ets family members recognize DNA sequences named Ets binding sites or EBS containing the purine-rich core motif GGAA/T ⁸. Binding of Ets1 to these DNA motifs is controlled by other parts of the protein, including the carboxyl-terminal end ⁹ and the exon VII encoded region ¹⁰. EBS are essential in the transcription of various cellular promoters ⁸, including the promoters of genes encoding the transcription factors c-Fos ¹¹, c-Jun ¹² and c-Myc ¹³, growth factor receptors such as VEGFR-1 ¹⁴ and adhesion molecules such as β 2 integrin ¹⁵. Moreover, co-transfection experiments demonstrated that Ets proteins take part in the transcriptional regulation of the cellular genes encoding collagenase-1 ^{16,17}, stromelysin-1 ¹⁸, u-PA ^{19,20}, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1 ²¹), and α 4 integrin subunit ²².

During normal and pathological development, the expression pattern of Ets1 transcripts correlates with the occurrence of invasive processes ²³. In chick and mouse embryos, Ets1 is expressed in endothelial cells during angiogenesis, in mesenchymal cells which surround

growing and invading epithelial buds and in epithelial cells during epithelial to mesenchyme transitions ^{24,25}. Similarly, Ets1 transcripts are expressed in stromal endothelial cells during tumor angiogenesis and in fibroblasts surrounding invasive carcinomas ²⁶⁻²⁸. The expression patterns of Erg and Fli, but not of Ets2, three close members of Ets1 within the Ets family, overlap the expression pattern of Ets1 in mesodermal derivatives, including endothelial cells, during early embryonic development ²⁹. These results suggest that Ets1 and other members of the family can play a role in the regulation of invasive processes *in vivo*, such as the formation of new blood vessels.

In order to investigate the biological functions of Ets1 and family members in endothelial cells, we established endothelial cell lines expressing the DNA binding domain of Ets1 (Ets1-DB). This domain was introduced in a replication defective recombinant retrovirus, which was used to infect a brain capillary mouse endothelial (LIBE) cell line and a mouse aorta endothelial (MAE) cell line. LIBE cells are derived from the brains of newborn transgenic mice expressing a temperature-sensitive variant of SV40 large T under the control of the H-2Kb promoter ³⁰. These cells display endothelial cell-specific characters and are able to differentiate into capillary-like structures ³⁰. MAE cells are derived from normal mice ³¹. The effects of the Ets1 dominant negative mutant were assessed on endothelial cell proliferation, migration, adhesion properties and ability to form capillary-like structures *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture :

Virus packaging murine fibroblasts (GP+E86, ³²), murine aortic endothelial cells (MAE, ³¹), murine brain capillary endothelial cells (LIBE, ³⁰) and murine fibroblasts (NIH-3T3) were kindly provided by Dr. A. Bank (Columbia University, New York), Dr. R. Auerbach (University of Wisconsin, Madison), Dr. L. Claesson-Welsh (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala) and Dr J.L. Darlix (Ecole Normale Superieure, Lyon) respectively and culture conditions were performed according to their recommendations. Briefly, GP+E86, NIH-3T3 and MAE cells were cultured at 37°C in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), containing 10% heat-inactivated calf serum (Hyclone), 8 µg/ml gentamycin, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. LIBE cells were cultured at 33°C, in DMEM containing 20% heat-inactivated calf serum, 8 µg/ml gentamycin, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 20 U/ml γ -interferon (Genzyme) and 0.1 ng/ml FGF-2 (R&D Systems). Except when mentioned, GP+E86, MAE and LIBE cells were cultured on tissue culture dishes, gelatin-coated tissue culture dishes (0.1%, w/v), and gelatin- (0.1% w/v) and fibronectin- (10µg/ml) coated tissue culture dishes, respectively. Cells were cultured and assayed in a 95% air / 5% CO² humidified atmosphere and routinely sub-cultured by trypsin/EDTA (0.1%) treatment and dilution at a 1/3 (LIBE and MAE) or 1/10 (GP+E86) ratio.

Cloning :

pCITE was a generous gift from Dr. P. Robbins (Department of Molecular Genetics and Biochemistry, Pittsburg, USA) and the MFG vector generously provided by Dr. R. Mulligan (Whitehead Institute, Cambridge, MA, USA). The cDNA sequence coding for the mouse Ets1 DNA-binding domain (corresponding to amino acids 306-423) was obtained by PCR amplification of mouse Ets1 cDNA ³³ with the following pair of primers: 5'-ATC TCG AGA CCA TGG ACT ATG TGC GTG ACC GT and 5'-ATC AAT TGT CTA TCC CAG CAG GCT CTG CAG. The Internal Ribosome Entry Site (IRES) and the neomycin-resistance gene were excised from the pCITE vector using EcoRI/BamHI sites. Ets1 amplified products digested with XhoI/MunI and the IRES-Neo fragment were ligated to XhoI/BamHI digested pBlueScript SK+ (pBS) plasmid (Stratagene). The resulting vector carries the Ets1-DB in front of the IRES sequence and the neomycin resistance gene. Both strands of the Ets1-DB were sequenced. The

Ets1-DB-IRES-Neo and the IRES-Neo inserts were then excised from the pBS plasmid and cloned into the NcoI/BamHI sites of the retroviral MFG vector in replacement of the Gag-Pol-Env genes, as described ³⁴.

Virus production :

GP+E86 cells were seeded at 150,000/ 10 cm² dish. The next day, cells were transfected using 2 µg of MFG plasmid and 12 µg of lipofectamine (Gibco) in 1 ml of OptiMEM for 6 hours. This medium was then replaced by the regular cultured medium and selection was started 48 hours after transfection by the addition of 0.8 mg/ml Geneticin (Gibco) to the culture medium. Viral particles were collected by culturing sub-confluent GP+E86 cells in 10 cm Ø dishes in 5 ml fresh medium overnight. The medium was then filtered (0.45 µm) and used for infection. Viral titration were performed by infecting mouse NIH-3T3 fibroblasts with serial dilutions of this medium and counting the number of Geneticin-resistant NIH-3T3 clones obtained after 7 to 10 days.

Infection of endothelial cells :

LIBE and MAE cells (150,000/ 10 cm² dish) were incubated for 6 hours with 1 ml of virus-producing GP+E86 cell supernatant containing 4 µg/ ml of polybrene (Aldrich) and selection started two days after, by the addition to the culture medium of 0.5 mg/ml and 0.8 mg/ml of Geneticin, respectively. After 10 days, cell colonies were pooled and further studied.

In vitro translation and electromobility-shift assay :

One µg of pBS Ets1-DB-IRES-Neo plasmid was mixed with 16.5 µl of rabbit reticulocyte lysate mix (Promega) containing 20 µCi [³⁵S]-methionine (1000 Ci/mmol, ICN) and 25 units of T3 polymerase in a final volume of 25 µl, and incubated for 2 hours at 30°C. After electrophoresis on 15% SDS-polyacrylamide gels, translation products were analyzed by autoradiography. Electromobility-shift assay were performed as described ³⁵ using the synthetic [³²P]-labelled 5'-GAT CTT CGA AAC GGA AGT TCG AG double-stranded oligonucleotide. Competition with non-specific DNA were performed using the CGA TGT GCC GGA TTA CGC TAG CCT GGG CCC TGG TAA GGC double-stranded random oligonucleotide.

Transactivation assays :

MAE cells were seeded at 150,000 cells/ 10 cm² dishes. The next day, the cells were transfected with a mixture of plasmid DNA (2 µg total, completed when necessary with the corresponding empty plasmid) and lipofectamine (12 µg, Boehringer) in 1ml of OptiMEM. After 6 hours, OptiMEM was replaced with culture medium. Forty eight hours later, the cells were collected in lysis buffer (Promega) and the extract assayed for protein content (BioRad). For CAT (chloramphenicol acetyl transferase) assay, mixtures containing 20 µg of protein extract, 50 nCi of [¹⁴C]-chloramphenicol and 0.5mM acetylCoA were incubated for 30 minutes or 1 hour at 37°C. Reaction products were separated by ascendant chromatography onto cellulose pre-coated plastic sheets (Macherey-Nagel) in chloroform/methanol (19:1, v:v) buffer and visualized by autoradiography. The percentage of acetylation was determined by calculating the ratio of acetylated versus non-acetylated [¹⁴C]-chloramphenicol after quantification using a Phosphor-Imager (Molecular Dynamics).

The reporter vectors used were E18pal+2-Δ56fos-CAT which contains a single copy of two EBS oriented 'head to head' and linked to a minimal fos promoter driving the CAT gene³⁶, and the E18m1 pal-Δ56fos-CAT which is identical to the previous vector except for a point mutation at the first EBS which prevents Ets1 DNA-binding³⁶.

Northern-blot :

Cells were grown to confluence in 78.5 cm² dishes. Total RNAs were isolated using the guanidinium isothiocyanate/CsCl method³⁷. RNAs (20 µg) were separated by electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, Amersham) and the membranes were incubated overnight at 42°C in hybridization buffer containing the [³²P]-labelled cDNA probes³⁷. Membranes were then washed twice in 2x SSC, 0.1% SDS at 60°C for 10 minutes, dried and exposed to autoradiography (Amersham MP film). Poly A+ RNAs were prepared as previously described³⁸ and analysed under similar conditions.

The Ets1 probe used for hybridation was the entire 1.6-kb BamHI fragment of the mouse Ets1 cDNA. The uPA probe corresponded to the Pst 1-Hind III 660-bp fragment of the mouse uPA cDNA the αV probe to the EcoR1 1620-bp fragment of the mouse cDNA, the α6 probe to the EcoR1-Pst1 411bp fragment of the mouse cDNA, the β1 probe to the Apa-EcoR1 500bp fragment of the mouse cDNA and the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH) probe was the 1.3-kb Pst I fragment of the rat GAPDH cDNA. The probes were labelled using a

random priming or a nick-translation system (Amersham) in the presence of [α - 32 P]-dCTP (3,000 Ci/mmol, ICN).

Immunoprecipitation :

Cells (150,000 cells/ 10 cm \varnothing) were cultured for 24 h. The medium was replaced by methionine- and cysteine- free modified Eagle's medium (MEM) for 2 hours. Cells were then incubated for three to four hours in 3 ml of methionine- and cysteine-free MEM containing 250 μ Ci [35 S]-methionine and -cysteine (Tran[35 S]-Label 1066 Ci/mmol, ICN), lysed and the cell extract prepared and used for immunoprecipitation as described ³⁷. Briefly, cell extracts containing identical amounts of trichloroacetic acid-precipitable [35 S]-labelled material were incubated in the presence of an anti-Ets1-DB rabbit polyclonal antibody and immuno-adsorbed onto Protein-A-agarose beads (Pharmacia). Proteins were then separated onto 15% SDS-polyacrylamide gels, the gels were fixed, treated with Amplify (Amersham) and exposed to Hyperfilm MP (Amersham).

Proliferation assay :

LIBE and MAE cells were seeded at 9,500 cells/4.5 cm² wells and 12,000 cells/ 4.5 cm² wells, respectively, cultured for the indicated times, collected with a 0.1% trypsin/EDTA solution and counted using a Coulter counter (Coulter Electronic).

Adhesion assay :

Bacteriological plastic 24-well plates (2 cm²/ well, Polylabo) were coated by incubation for 2 hours at 37°C with 0.3 ml DMEM containing the indicated amount of laminin (Becton-Dickinson), type I collagen (Upstate Biotechnology) or fibronectin (Sigma). The wells were then incubated for 30 minutes at 37°C or 33°C in 0.3ml MEM containing 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA, Sigma), rinsed once with MEM/ 0.02% BSA and immediately used. Confluent MAE or LIBE cells were harvested using a 0.1% trypsin/ EDTA solution, collected in culture medium, counted, washed three times in DMEM by centrifugation at 500 g for 10 min and finally resuspended in DMEM/ 0.02% BSA. Cells were transferred to the coated wells (100,000 cells/ 0.5 ml/ well) and allowed to adhere for 10 minutes. The cell supernatant was collected and trypsin/EDTA (0.1%) was added in order to recover the adherent cells. Both non-adherent (supernatant) and adherent (trypsin/EDTA-treated) cells were counted using a Coulter counter.

The percentage of adhesion is the number of adherent cells divided by the total number of cells recovered from each well.

Actin filaments staining, vinculin and α -actinin detection:

LIBE (40,000 cells/2 cm² well) and MAE cells (20,000cells/2 cm² well) were cultured onto glass coverslips coated with laminin (20 μ g) as described above, during 3 and 18 hours, respectively. Cells were then fixed in 60 mM PIPES, pH 6.6, 25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM EGTA (PHEMS), 4% paraformaldehyde, for 10 minutes at room temperature. For actin staining, cells were permeabilized by incubation with cold (-20°C) acetone for 1 minute, incubated in PHEMS containing 5 U/ ml Bodipy-phalloidin (Molecular Probes, Eugene, Oregon) for 45 minutes at room temperature, washed three times with PHEMS (5 min per wash) and briefly rinsed with distilled water. For vinculin and α -actinin staining, cells were treated with 0.25% Triton X-100 (v/v) for 5 min at room temperature, rinsed with PHEMS and incubated in PHEMS, 3% BSA for 2 hours before being incubated overnight with an anti-vinculin monoclonal antibody (Sigma) or an anti α -actinin rabbit polyclonal antibody (Sigma). After washes with PHEMS, the coverslips were incubated with FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody for vinculin detection or an FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody for α -actinin detection (Sigma). After washes with PHEMS buffer, the coverslips were mounted using Prolong antifade reagent (Molecular Probe, Eugene, Oregon).

Cell culture on Matrigel gels :

Plates (2 cm²/well, Nunc) were coated with Matrigel (250 μ l/ well, Becton-Dickinson) at 37°C for 30 minutes. LIBE (60,000 cells/ well) or MAE (120,000 cells/ well) cells were seeded onto the Matrigel gel and incubated for 18 hours or 5 days. At the end of the experiment, the cells were fixed and stained (Diff-Quick staining kit, Dade), and examined by light microscopy.

RESULTS

Vector constructions and functional characterization :

The viral constructs are schematically presented in Figure 1. The 78 amino-acids Ets1-DB protein contains the DNA binding domain of Ets1 and the presumed nuclear transport signal ³⁹, while the C-terminal inhibitory region of Ets1 ⁹ was deleted. The IRES sequence was used in order to translate both the Ets1-DB and neomycine-resistance proteins from a single viral mRNA. A second plasmid carrying the IRES and Neo sequences was constructed and used as a control throughout this study. These Ets1-DB-IRES-Neo or IRES-Neo sequences were inserted into a pBS plasmid and then into a MFG retroviral vector (Figure 1), and named MFG-DB and MFG-Neo, respectively.

The ability of the Ets1-DB protein to bind to a double stranded oligonucleotide containing an Ets-binding site (EBS) was monitored by electro-mobility shift assay. The recombinant Ets1-DB protein was produced using an *in vitro* translation system and was found to bind specifically to the [³²P]-labeled EBS (Fig. 2A). This binding was competed for by a 250-fold excess of unlabelled probe, but not by a 250-fold excess of unlabelled non-specific DNA. The addition of an anti-Ets1-DB antibody prevented the Ets1-DB/EBS probe complex from entering the gel (Fig. 2A). The Ets1-DB protein, therefore, binds specifically and reversibly to an EBS sequence, and the complex is recognized by a specific anti Ets1-DB antibody.

The ability of the Ets1-DB protein to inhibit the transactivation of a promoter containing Ets-binding sites was assessed in MAE endothelial cells. Cells were co-transfected with increasing amounts of the MFG-DB vector and with the reporter vector E18+2 pal-Δ56 fos-CAT (Fig 2B). In the absence of MFG-DB, the percentage of acetylation, reflecting the basal CAT activity, was 17% ; this percentage decreased to 7% in the presence of 1.5 μg/ml of MFG-DB encoding plamid (Fig. 2B). Transient transfections were also performed using E18 m1 pal-Δ56 fos-CAT, the mutant version of the previous vector. The basal acetylation (9 %) did not vary upon addition of increasing amounts of MFG-DB, showing the specificity of action of the Ets1-DB protein (Fig. 2C).

Endothelial cell infection and functional expression of the Ets1-DB protein :

Packaging GP+E86 cells were transfected with the MFG retrovirus constructs in order to produce recombinant ecotropic retroviruses. Cells were selected for neomycin resistance and

subsequently assayed for virus production. The viral titer estimated by infection of NIH-3T3 was higher than 10^6 cfu/ ml for each virus-producing cell line (data not shown). Two viral transcripts corresponding to the unspliced and spliced RNAs were expected, since the recombinant constructions were cloned after the splicing site of the MFG virus. Expression of these two transcripts in GP+E86-MFG-Neo or -MFG-DB cell lines was detected by Northern-blotting using an IRES-Neo or an ets1 probe (Fig. 3A, B). Immunoprecipitation experiments showed that GP+E86-MFG-DB cells expressed a protein at the apparent expected molecular weight of approximately 13 kDa, which was recognized by the anti-Ets1-DB antibody (Fig. 3 C).

LIBE and MAE mouse endothelial cells were infected with viral supernatants obtained from these GP+E86 cells and were selected for neomycin resistance. Four cell lines were produced, LIBE-Neo, LIBE-DB, MAE-Neo and MAE-DB cells, and were checked for viral mRNA expression (data not shown) and recombinant Ets1-DB protein expression (Fig. 3D).

Thus endothelial cells infected with the MFG-DB retrovirus constitutively expressed the Ets1-DB protein that should inhibit transactivation of promoters containing Ets-binding sites. To test the efficiency of Ets1-DB in infected cells, we transiently transfected MAE-Neo and MAE-DB cells with increasing amounts of E18+2 pal- Δ 56 fos-CAT reporter vector, already used above (see Fig. 2). Indeed, a dose-dependent stimulation of the transactivation potential of the EBS reporter vector was obtained in MAE-Neo cells, whereas this effect was nearly lost in MAE-DB cells (Fig. 4). The efficiency of transfection was similar for these two cell lines, as assessed by measuring β -galactosidase activity following transfection of a pSG5-lacZ plasmid (data not shown).

The Ets1-DB protein does not affect endothelial cell growth :

The effect of Ets1-DB expression on endothelial cell growth was determined by measuring the proliferation rate of MAE and LIBE infected cells (-Neo, -DB). Non infected endothelial cells (WT) were also examined in order to exclude a potential side-effect of the viral infection. Both MAE and LIBE cell lines showed a classical growth curve, and the rate of growth of -DB cells was equivalent to that of WT or -Neo cells (Fig. 5). LIBE and MAE cell lines developed cell contact inhibition of growth and the cell number reached a plateau at 1.10^6 cells/ well and 7.10^5 cells/well, respectively, after 7 days.

The Ets1-DB protein increases endothelial cell spreading :

Since the initial infection, we noticed a change in the morphology of the Ets1-DB endothelial cells as compared to the control endothelial cell lines. As shown in figure 6, LIBE-WT and -Neo cells had a roughly triangular shape and were elongated (Fig. 6A, B), whereas LIBE-DB cells spread and flatten (Fig 6C). In addition, LIBE-WT and -Neo cells were regular in shape, whereas LIBE-DB cells presented more lamellipodia at their periphery (Fig. 6C). MAE cells were larger, spread more than LIBE cells did, and had a larger nucleus/cytoplasmic surface ratio (compare Fig. 6 A and D). These differences in morphology might be due to their different origin or to the fact that they grow on different substrates (gelatin versus fibronectin). Nonetheless, similarly to the LIBE-DB cells, MAE-DB cells appeared to spread and to flatten in comparison to MAE -WT and -Neo cells (Fig. 6F). When the MAE or LIBE cell lines reached confluency, these morphological differences were still visible (Figure 6G-J) and disappeared after a few days at confluence (data not shown).

The Ets1-DB protein increases endothelial cell adhesion :

Endothelial cells expressing the Ets1-DB protein were checked for adhesion on plastic and on various extra-cellular matrix substrates: laminin, fibronectin and type I collagen (Fig. 7). In preliminary experiments we established that most of the cells were attached within 1-2 hours and that a 10 minutes time-point gave the optimal conditions for the analysis of their relative cell adhesion properties. After 10 minutes, both LIBE -Neo and -DB cells adhered better onto fibronectin and laminin, the major constituents of the basement membrane, than onto collagen I and plastic (Fig. 7A). In addition, LIBE-DB cells adhered better than LIBE-Neo cells onto plastic, laminin and collagen I (Fig. 7A). On laminin, the differential effect was more evident at 1 $\mu\text{g}/\text{well}$, with 44% of LIBE-DB cells attached compared to 21% of LIBE-Neo cells. At high laminin concentration (20 $\mu\text{g}/\text{well}$), the percentage of attached LIBE -Neo and -DB cells was almost identical (64 and 68%, respectively). This dose-dependent effect was also observed using collagen type I as a substrate. On fibronectin, no differences in adhesion between the two cell types was observed both at 2 and 20 $\mu\text{g}/\text{well}$ (Fig. 7A). At lower concentrations of fibronectin (50-100 ng/well) the LIBE-Neo cells appeared to attach with nearly the same efficiency to the substrate than LIBE-DB cells (data not shown). MAE cell lines gave similar results, both for their relative ability to bind to the various substrates and for the increased ability of MAE-DB cells to attach onto plastic, laminin and collagen compared to MAE-Neo cells (Fig. 7B). A noticeable difference was that MAE cells have a greater ability to attach onto type I collagen than LIBE cells. The efficiency of the Ets1-DB to promote cell adhesion was more obvious at the

lowest concentration of laminin tested (0.5 $\mu\text{g}/\text{well}$): MAE-DB cells had a 4-fold ability to adhere to this substrate as compared to MAE-Neo cells.

Overall, endothelial cell lines expressing Ets1-DB showed increased properties to adhere after seeding onto various extracellular matrix components, compared to control cell lines.

The Ets1-DB protein induces cytoskeleton re-organisation :

The distribution of cytoskeletal elements was examined in endothelial cell lines grown on laminin, the extra-cellular matrix component that induced the greatest differential effect of Ets1-DB on cell adhesion (see Fig. 7). After immunofluorescence staining with rhodamine-phalloidin, LIBE-Neo cells exhibited distinct stress fibers extending along the axis of the cell and these microfilament bundles were clearly parallel to each other (Fig. 8A). In contrast, LIBE-DB cells showed a more diffuse distribution of microfilaments and only short microfilaments bundles were present (Fig. 8D). A similar effect was seen in MAE cells: in the MAE-Neo cells actin was organized in numerous long microfilament bundles that crossed the whole cell (Fig. 8G), whereas in MAE-DB cells actin formed short microfilament bundles and the microfilaments appeared more randomly arranged (Fig. 8J).

Focal contacts are cell membrane associated formations which consist of a cytoplasmic area composed of cytoskeletal elements, a transmembrane connecting region, and an extra-cellular area with extra-cellular matrix proteins. Vinculin, a major intra-cellular component of focal contacts, was detected both in LIBE and MAE cells. In LIBE-Neo cells, vinculin was present in rod-like structures restricted at the periphery of cells and in particular in the most proximal regions of lamellipodia (Fig. 8B). In LIBE-DB cells, vinculin was detected in rod-like structures localized throughout the entire cell area (Fig. 8E). In MAE -Neo and -DB cells, vinculin appeared homogeneously distributed in the cells, albeit the number of spots appeared greater in MAE-DB than in MAE-Neo cells (Fig. 8H and K). The distribution of α -actinin, another major component of focal contacts, was subsequently analyzed. In both Neo endothelial cell lines, α -actinin was observed in the whole cell body as a diffuse staining (Fig. 8C and I). In DB cells, α -actinin was similarly distributed, but appeared to form locally more condensed spots (Fig. 8F and L).

These results suggest that the expression of Ets1-DB in endothelial cells, in particular in LIBE cells, induced the reorganization of the cytoskeleton and increased the number of focal adhesion contacts that mediate binding interactions with the extra-cellular matrix.

The Ets1-DB protein affects *in vitro* angiogenesis :

The effect of Ets1-DB on the ability of endothelial cells to form capillary-like structures was examined following seeding on Matrigel, a basement membrane extract. Within a few hours, LIBE-WT and LIBE-Neo individual cells attached onto the gel were either round or fusiform, with budding cellular extensions. Within 18 hours, LIBE-WT and LIBE-Neo cells formed a network of branching cellular extensions connecting compact cell clusters (Fig. 9, A and B). In these branching cellular extensions (i.e. the capillary-like structures⁴⁰) the cell nucleus and cytoplasm were visible after staining, whereas individual cells could not be distinguished within the compact clusters. LIBE-DB cells formed a similar network, albeit the spreading ability of these cells was clearly increased (compare Fig. 9, A-B and C). They organized into more scattered cell groups in which each endothelial cell could be easily identified due to an increased spreading onto the substrate. After staining, the nucleus and cytoplasm of all cells were clearly distinguishable.

Within 18 hours, the organization of MAE-Neo cells on Matrigel (Fig.9D) was similar to the one of LIBE -WT and LIBE -Neo cells. An increased spreading was observed when MAE-DB cells were compared to control MAE cells (Fig 9E). Within 5 days of culture, MAE cells formed very dense clumps with few capillary-like structures in between (Fig. 9F and G). At the periphery, cells emerged from these clumps. Again, MAE-DB cells formed less compact clumps than MAE-Neo cells on Matrigel, (compare Fig 9, G and F) with numerous spread cells at their periphery.

These results demonstrate that the expression of Ets1-DB impaired the ability of endothelial cells to form capillary-like structures onto Matrigel, as a consequence of an increased spreading onto the substrate.

mRNA expression of potential target genes for Ets family members :

We examined by Northern blot the possible modification of the expression of genes involved in cell adhesion or of genes identified as targets genes for the Ets transcription factors (Fig. 10). Integrins are the major extra-cellular matrix adhesion receptors. The $\alpha V\beta 3$ integrin is able to recognize most matrix proteins including fibronectin, laminin and collagen. The $\alpha 6\beta 1$ integrin exclusively binds to members of the laminin family⁴¹. Northern blot analysis showed that αV , $\alpha 6$ and $\beta 1$ integrin subunits transcripts were not differentially expressed in LIBE-WT, -Neo or -DB cells. VE-cadherin is a cell-cell adhesion molecule that plays an important role in

endothelial cells⁴²; its transcripts were not detectable in these cells. u-PA gene expression has been shown to be up-regulated by angiogenic factors in cultured endothelial cells. Furthermore it has been identified as an *in vitro* target gene for Ets1^{19,20}. Accumulation of uPA transcripts was not modified in DB cells when compared to WT and Neo cells. Similar results were obtained with MAE-WT, -Neo and -DB cells (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we examined the effects of the Ets1-DB protein, a dominant negative mutant of the Ets1 transcription factor, on the behavior of endothelial cells in culture. We found no obvious effect on cell proliferation. In contrast, this protein induced changes in cell morphology and cytoskeleton organization, increased the adhesion properties of endothelial cells and affected their ability to form capillary-like structures in vitro. Similar results were obtained using either a brain capillary cell line issued from transgenic mice or normal aortic endothelial cells. Taken together, these data suggest a function for Ets family members in the regulation of endothelial cell adhesion onto extra-cellular matrix proteins.

A major advantage in using a retroviral vector to express mutant proteins in endothelial cells is that the infection rate was very high (approximately 80%) as compared to a few percent for the transfection rate with plasmid vectors. Since infection was efficient, most endothelial cells acquired the gene upon infection, and the subsequent selection was not clonal. This was particularly important in order to observe the effect of the Ets1-DB protein independently of the integration site of the provirus. The sequence of the DNA binding domain of Ets1 was chosen so as to obtain a maximal efficiency of binding to EBS and consequently a maximal inhibition of the transcription of EBS-driven genes in target cells. The C-terminal part of Ets1 is a repressor of DNA-binding since Ets1 binding to EBS sequences increased after the deletion of its 16 most C-terminal amino acids⁹. Preliminary results showed that the phenotypic changes induced by the expression of a Ets1 mutant containing the DNA binding domain with this C-terminal region were less severe than the effects obtained with the sole Ets1-DB (data not shown). Therefore, this latter mutant without this C-terminal region was used throughout our study. This Ets1-DB protein had all the expected properties of a dominant negative mutant. It bound specifically to the EBS and induced a 50% decrease in the transcription rate of an EBS-driven reporter gene in transient transfection assays. Since this inhibition was not observed when the EBS site was mutated in the reporter gene, Ets1-DB dominant negative mutant was specific of EBS-regulated genes. A similar dominant negative mutant strategy was previously developed with different Ets family members in fibroblasts and their DNA binding domains were shown to act as dominant negative mutants^{43, 44}. The DNA binding domains of PU1, Ets1 and Ets2 were efficient to revert Ras transformed cells⁴³ and the DNA binding domain of Ets2 was also used to suppress signal transduction and mitogenesis induced by both Ras and CSF-1 in NIH3T3 cells⁴⁴. The

level of inhibition obtained in the present study did not exceed 50%, either in transiently transfected cells or in the virus infected cells where the constitutive expression of Ets1-DB was driven by the viral LTR. Several mechanisms could lead to this result. The level of expression of the dominant negative mutant protein may not have been high enough to saturate the Ets-binding sites of the transfected reporter vectors, or binding of Ets1-DB to unidentified co-factors could have prevented its binding to some of the target DNA sequences introduced in these cells ⁴⁵.

The expression of Ets1, Erg and Fli in endothelial cells during angiogenesis suggested that these Ets family members could take part in the transcriptional regulation of endothelial cell proliferation, basement membrane degradation, migration or capillary formation.

The expression of Ets1-DB did not affect the proliferation of either LIBE or MAE endothelial cells. A similar result has been obtained in studies where ets1 antisense oligonucleotides were used in human endothelial cells ⁴⁶. These results suggest that Ets family members are not involved in endothelial cells proliferation. In addition, although FGF2 and VEGF stimulated bovine aorta endothelial cell proliferation whereas TGF β and TNF α inhibited it, all these factors induced ets1 mRNA accumulation (not shown), further indicating the absence of correlation between ets1 expression and endothelial cell proliferation.

The motility of MAE and LIBE cell lines was measured following the wounding of a confluent monolayer ⁴⁷ and no clear difference was observed between the migration rates of the Ets1-DB and control cells (not shown). In contrast Ets1 antisense oligonucleotides inhibited EGF- or FGF1-induced migration ⁴⁶ and VEGF-induced invasion ⁴⁸ in human endothelial cells. Cell migration and invasion have been correlated in vitro with the expression of extracellular matrix degrading proteases such as u-PA. We found that the expression of Ets1-DB did not change the amount of u-PA mRNAs in MAE and LIBE cells, whereas Ets1 antisense oligonucleotides decreased uPA mRNAs accumulation ^{46, 48}. Discrepancies between these results presumably reflect differences in the cells and the strategies used in the studies (blockade of Ets1 expression versus competition with different Ets family members).

Since proteases are important in the degradation of the extra-cellular matrix during angiogenesis, their genes were expected to be primary targets of Ets1 during this process. However, during mouse embryonic development, Ets1 and uPA transcripts are not detected in the same cells, except in endothelial cells within the maternal decidua from E7.5 to E10.5 during embryonic implantation ⁴⁹. Collagenase-1 is not expressed either in the same areas than ets1 during mouse development ³⁸. In addition, collagenase-1, stromelysin-1 or uPA transcripts are

usually not detected in the walls of blood vessels irrigating carcinomas ^{27,28}. All these results taken together suggest that these putative target genes are not transcriptionally regulated by Ets1 during angiogenesis *in vivo*.

Several lines of evidence indicate that Ets family members take part in the transcriptional regulation of cell adhesion in different cell types. Thus, Ras transformed NIH3T3 cells expressing the DNA binding domain of PU.1 were larger and flatter, with an increased adhesion to their substrate ⁴³. The overexpression of fli during embryogenesis in the *Xenopus* resulted in a lack of adhesion between cell separating embryonic layers or in the disorganisation of endothelial cell monolayers ⁵⁰. Two initial observations led us to examine the adhesion properties of endothelial cells expressing Ets1-DB. First, a change in morphology was observed, with LIBE DB and MAE DB cells being enlarged and flattened compared to their respective control cell lines. These modifications were clear at low density and persisted until confluency. At high density, differences in morphology were lost suggesting that these endothelial cell lines had kept their overall ability to establish cell-cell and cell-matrix contacts. Second, the Ets1-DB cells consistently took longer than control cells to detach from the culture dishes when treated with trypsin/EDTA, suggesting that the adhesion of the Ets1-DB cells was stronger than that of wild type cells. Indeed, the Ets1-DB was found to increase endothelial cell adhesion onto laminin and type I collagen. This effect was best seen with low amounts of matrix coating, suggesting either an increase in adhesion receptor number or in their relative affinity for the matrix molecules. Since LIBE- and MAE-DB cells no longer attached onto the various substrates tested in the absence of calcium and magnesium in the medium (data not shown), their adhesion to these molecules was most probably mediated by integrin adhesion receptors ⁵¹. Analysis of integrin mRNA expression did not support the hypothesis of an increased number of integrin receptors in Ets1-DB cells. The $\alpha 6\beta 1$ integrin mediates cell adhesion almost exclusively onto laminins ^{41,52,53}, but no difference was observed in the accumulation of the $\alpha 6$ or $\beta 1$ integrin sub-units mRNAs between control and Ets1-DB expressing endothelial cells. The αv integrin is involved in angiogenesis ^{54,55} but its expression was not affected by the presence of Ets1-DB in endothelial cells either. The expression of other integrins in these cells is currently studied. The affinity of integrins for extracellular matrix molecules is subject to multiple levels of regulation. It is thus possible that Ets1-DB did not affect integrin expression but rather disturbed the expression of a protein that modified integrin distribution, association on the cell surface and subsequently its affinity. Alternatively, since Ets1-DB expression resulted in an overall greater

ability to adhere, it may also have disturbed the expression of extracellular proteins that modulate cell matrix interactions ⁵⁶. Cell adhesion involves three classes of molecules which link the extracellular matrix to the intracellular cytoskeleton: extra-cellular matrix proteins (collagens, fibronectins, laminins, thrombospondin or SPARC), which form the substrate on which the cells adhere, adhesion receptors (integrin, cadherin, immunoglobulin and proteoglycan superfamilies members) which recognize the ECM molecules, and cytoplasmic plaque/peripheral membrane proteins which link the adhesion receptors to the cytoskeleton (for review see ⁵¹). A change in adhesion and spreading may thus reflect a change in the distribution of cytoskeleton components. We investigated further the effects of Ets1-DB in MAE and LIBE cells by describing changes in the cytoskeleton organisation.

Actin cables were randomly arranged in cells expressing Ets1-DB whereas they were neatly aligned in control endothelial cells. When Ets1-DB was expressed, vinculin, an intra-cellular link between adhesion receptors and cytoskeleton ⁵⁷, was distributed in the whole cell while its distribution was restricted to lamellipodia in control endothelial cells plated onto laminin. In parallel, the distribution of α -actinin, another linkage molecule between adhesion receptors and the organization of the cytoskeleton, was also affected by Ets1-DB expression. All this suggests that Ets1-DB expression induced changes in the arrangement and number of focal plaques and subsequently in the organization of the cytoskeleton. The organization of actin fibers is known to be dependent upon cell-substrate interactions. For example, actin stress fibers align when endothelial HUVEC cells are incubated with the YIGSR peptide, the laminin site responsible for cell-matrix and cell-cell interaction, whereas actin fibers are not aligned when cells are plated on plastic ⁵⁸.

The effect of Ets1 DB on endothelial cell spreading and adhesion seemed responsible for their inability to form capillary-like structures *in vitro*. When plated onto Matrigel, a reconstituted basement membrane rich in laminin, endothelial cells expressing Ets1-DB formed scattered clumps in which each cell was spread onto the gel while wild type or IRES-Neo endothelial cells formed compact clumps connected by capillary-like structures. Such structures have been previously described with human endothelial cells plated onto Matrigel ⁴⁰. These structures have internal lumens ⁵⁹ and resemble early capillaries. Two Matrigel components, laminin and entactin, are both essential for tube formation on Matrigel ⁵⁸. In our conditions, it seemed that cells expressing Ets1-DB were able to adhere, migrate and to form a network of interconnected cell clumps but remained spread on the Matrigel. Formation of the final cord-like

structures did not occur anymore, as if the cells had lost the capacity to form a lumen. From our previous observations on cell adhesion, one possible explanation is that the Ets1-DB cells became too strongly anchored onto the substrate to form a capillary on Matrigel.

The interactions between endothelial cells and the extra-cellular matrix are essential for cell growth and capillary formation *in vivo*. Our results suggest that Ets family members are involved in the transcriptional regulation of these interactions, i.e. in the partial detachment of the cells from the substrate allowing endothelial cells to rearrange and form a new capillary. In order to assess the role of Ets1 during angiogenesis *in vivo*, experiments are in progress in order to express the dominant negative mutant of Ets1 in endothelial cells with the retroviral vectors described in this study ⁶⁰.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Y.S. Kanwar (Northwestern University, Chicago, USA), Dr. B. Hierck (Leiden University, Leiden, The Netherlands), Dr. E. Dejana (Istituto Mario Negri, Milano, Italy) for providing the α V, α 6 and β 1, and VE-cadherin probes respectively. We thank Dr. P. Robbins (Department of Molecular Genetics and Biochemistry, Pittsburg, USA) for the pCITE plasmid and Dr. R. Mulligan (Whitehead Institute, Cambridge, Massachusetts) for the MFG vector. We also thank Dr. A. Bank (Columbia University, New York) for the virus packaging murine fibroblasts GP+E86, Dr. R. Auerbach (University of Wisconsin, Madison) for the murine aortic endothelial cells, Dr. L. Claesson-Welsh (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala) for the murine brain capillary endothelial cells and Dr J.L. Darlix (Ecole Normale Supérieure, Lyon) for the murine fibroblasts (NIH-3T3). We thank Gérard Torpier and Monique Arpin for their assistance with the immunofluorescence experiments.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 : Viral constructs

The Ets1 dominant negative mutant used in these studies was a truncated mouse Ets1 protein containing its DNA-binding domain (DB), from amino acid 306 to amino acid 423. The cDNA encoding this mutant was cloned in front of the IRES-Neo sequences and inserted into the genome of a MFG virus (MFG-DB). The control virus was obtained from the same construction, lacking the Ets1-DB domain (MFG-Neo). Ψ^+ , SD and SA are the packaging, splice donor and acceptor sites, respectively.

Figure 2 : The Ets1-DB protein binds to an EBS oligonucleotide and inhibits the transactivation of an EBS-reporter vector

Left panel: Electro-mobility shift assay performed without (lane 1) or with (lanes 2-5) the Ets1-DB protein produced in reticulocyte lysate, in the presence of a [32 P]-labelled EBS oligonucleotide. The binding of Ets1-DB to this labelled oligonucleotide was competed for in the presence of a 250-fold excess of unlabelled EBS oligonucleotide (SP, lane 3) or a 250-fold excess of unlabelled non specific oligonucleotide (NS, lane 4). The complex was super-shifted by addition of an anti-Ets1-DB antibody (anti-Ets1, lane 5). Arrow: position of the complex formed by Ets1-DB, arrowhead: [32 P]-free probe.

Right panel: MAE endothelial cells were transiently transfected with increasing concentrations of MFG-DB plasmid and 0.5 μ g/ml of either the E18pal +2- Δ 56fos-CAT reporter vector (top) or a mutated variant, the E18m1 pal- Δ 56fos-CAT reporter vector (bottom). Cells were cultured for 48 hours and CAT assays were performed on cell extracts. Experiments were repeated twice and gave similar results.

Figure 3 : Expression of viral transcripts and of the Ets1-DB protein in packaging GP+E86 cells and in infected LIBE and MAE endothelial cells

A, B: Northern blot analysis of total RNAs prepared from GP+E86 cells transfected without (GP+E86-WT) or with MFG-Neo vector (GP+E86-MFG-Neo) (panel A), and of poly A+ RNAs prepared from GP+E86 cells transfected without (GP+E86-WT) or with MFG-DB vector (GP+E86-MFG-DB) (panel B). Viral transcripts were detected with a [32 P]-labeled neo probe (panel A, arrowheads) ; viral transcripts encoding the Ets1-DB and endogenous ets1 transcripts were detected with a [32 P]-labeled ets1 probe (panel B, arrowheads and arrow respectively).

C, D: Immunoprecipitation analysis of the Ets1-DB protein (arrow) expressed in GP+E86 cells transfected without (GP+E86-WT) or with MFG-DB vector (GP+E86-MFG-DB) (panel C) and in MAE and LIBE cells non-infected (-WT), infected with the GP+E86-MFG-Neo supernatant (-Neo) or with the GP+E86-MFG-DB supernatant (-DB) (panel D).

Figure 4 : The Ets1-DB protein expressed in infected MAE endothelial cells inhibits the transactivation of an EBS-reporter vector.

Infected MAE-Neo (A) and MAE-DB cell lines (B) were transiently transfected with increasing concentrations of E18pal+2 - Δ 56fos-CAT reporter vector. Cells were cultured for 48 hours and the CAT activity was determined on cell extracts. Experiments were repeated twice and gave similar results.

Figure 5 : Growth of non infected and infected endothelial cells

LIBE (A) and MAE (B) cells were seeded at low density and cultured over a 7-day period (\blacktriangle , non infected ; \blacksquare , MFG-Neo-infected ; \bullet , MFG-DB-infected). Cells were counted every one or two days. Each value corresponds to the average of two cell counts and each experiment was duplicated.

Figure 6 : Morphology of non infected and infected LIBE and MAE endothelial cells

A-F: LIBE-WT cells (A), LIBE-Neo (B) or LIBE-DB (C) cells, and MAE-WT (D), MAE-Neo (E) or MAE-DB (F) cells were seeded at low density and photographed the next day. The bar represents 50 μ m.

G-J: Morphology of LIBE -Neo (G) and -DB (H) cells and of MAE-Neo (I) and -DB (J) cells, when they had reached confluency. The bar represents 50 μ m.

Figure 7 : Attachment of infected endothelial cells to matrix proteins

Adhesion assays were performed with infected LIBE (A) or MAE (B) cells, seeded onto bacteriological plastic dishes, coated without (P) or with increasing amounts of laminin (laminin), type I collagen (Collagen I) or fibronectin (Fibronectin). Ten minutes after plating, the percentage of attached Neo- (white bars) or DB- (black bars) endothelial cells, was measured. Values represent the average of two counts.

Figure 8 : Actin, vinculin and α -actinin distribution in infected endothelial cells

Actin (A, D, G, J), vinculin (B, E, H, K) and α -actinin (C, F, I, L) were detected by immunofluorescence staining in infected LIBE (A-F) and MAE (G-L) cells cultured onto laminin-coated coverslips during respectively 3 and 18 hours. The bar represents 10 μ m.

Figure 9 : Capillary-like structure formation by infected endothelial cells cultured on Matrigel.

Wild type (A), Neo- (B,D,F), or DB- (C,E,G) infected endothelial cells were cultured on Matrigel for 18 hours (LIBE, A-C or MAE, D,E) or for 5 days (MAE, F,G), fixed and stained. The bar represents 100 μ m.

Figure 10: Expression of potential target genes of Ets family members

Total mRNAs were prepared from LIBE-WT, -Neo and -DB cells and analyzed by Northern blot. The ets1 probe detected endogenous ets1 (arrow) as well as viral transcripts in LIBE-DB cells (arrow head). The accumulation of α v, α 6 and β 1 integrin, uPA and GAPDH transcripts is shown. Equal loading of RNA in various lanes was assessed with a GAPDH probe.

REFERENCES :

1. Ausprunk DH, Folkman J: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14:53, 1977
2. Folkman J, D'Amore PA: Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* 87:1153, 1996
3. Risau W: Mechanism of angiogenesis. *Nature* 386:671, 1997
4. Beck L, D'Amore P: Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB* 11:365, 1997
5. Leprince D, Gegonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stéhelin D: A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306:395, 1983
6. Nunn MF, Seeburg PH, Moscovici C, Duesberg PH: Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306:391, 1983
7. Crépieux P, Coll J, Stéhelin D: The Ets family of proteins : weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit. Rev. Oncogen.* 5:615, 1994
8. Ghysdael J, Boureux A: The ETS family of transcriptional regulators. *Progress in gene expression* (M. Karin, Ed.)
Birkhauser Verlag Basel/Switzerland :29, 1997
9. Hagman J, Grosscheld R: An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the *mb-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89:8889, 1992
10. Wasylyk C, Kerckaert JP, Wasylyk B: A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes and Dev.* 6:965, 1992
11. Hipskind RA, Rao VN, Mueller CGF, Reddy ESP, Nordheim A: Ets-related protein elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62^{TCF}. *Nature* 354:531, 1991
12. Coffey P, De Jonge M, Mettouchi A, Binetruy B, Ghysdael J, Kruijer W: *junB* promoter regulation : Ras mediated transactivation by c-Ets-1 and c-Ets-2. *Oncogene* 9:911, 1994
13. Roussel MF, Davis JN, Cleveland JL, Ghysdael J, Hiebert SW: Dual control of myc expression through a single DNA binding site targeted by ets family proteins and E2F-1. *Oncogene* 9:405, 1994

14. Wakiya K, Begue A, Stehelin D, Shibuya M: A cAMP response element and an Ets motif are involved in the transcriptional regulation of flt-1 tyrosine kinase (vascular endothelial growth factor receptor 1) gene. *J. Biol. Chem.* 271:30823, 1996
15. Böttinger EP, Shelley CS, Farokhzad OC, Arnaout MA: The human β 2 integrin CD18 promoter consists of two inverted Ets cis elements. *Mol. Cell. Biol.* 14:2604, 1994
16. Gutman A, Wasylyk B: The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The Embo J* 9:2241, 1990
17. Buttice G, Kurkinen M: A polyoma enhancer A-binding protein-3 site and Ets-2 protein have a major role in the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate response of the human stromelysin gene. *J. Biol. Chem.* 268:7196, 1993
18. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B: c-ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *The Embo J* 10:1127, 1991
19. Nerlov C, De Cesare D, Pergola F, Caracciolo A, Blasi F, Johnsen M, Verde P: A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* 11:4573, 1992
20. Stacey KJ, Fowles LF, Colman MS, Ostrowski MC, Hume DA: Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Mol. Cell. Biol.* 15:3430, 1995
21. Logan SK, Garabedian MJ, Campbell CE, Werb Z: Synergistic transcriptional activation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promoter via functional interaction of AP-1 and Ets-1 transcription factors. *J. Biol. Chem.* 271:774, 1996
22. Rosen GD, Barks JF, Iademarco MF, Fisher RJ, Dean DC: An intricate arrangement of binding sites for the Ets family of transcription factors regulates activity of the α 4 integrin gene promoter. *J. Biol. Chem.* 269:15652, 1994
23. Vandenbunder B, Queva C, Desbiens X, Wernert N, Stehelin D: Expression of the transcription factor c-Ets1 correlates with the occurrence of invasive processes during normal and pathological development. *Invasion and Metastasis* 14:198, 1995
24. Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stehelin D: Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 107:265, 1989

25. Fafeur V, Tulasne D, Queva C, Vercamer C, Dimster V, Mattot V, Stehelin D, Desbiens X, Vandebunder B: The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-factor stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth and Diff.* 8:655, 1997
26. Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, Stéhelin D: The c-ets 1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathology* 140:119, 1992
27. Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandebunder B, Stehelin D: Stromal expression of c-ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* 54:5683, 1994
28. Bolon I, Gouyer V, Devouassoux M, Vandebunder B, Wernert N, Moro D, Brambilla C, Brambilla E: Expression of c-ets-1, collagenase 1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* 147:1298, 1995
29. Dhordain P, Dewitte F, Desbiens X, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M: Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mec. Dev.* 50:17, 1995
30. Kanda S, Landgren E, Ljungström M, Claesson-Welsh L: Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. *Cell growth and Diff.* 7:383, 1996
31. Auerbach R: Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int. J. Radiat. Biol.* 60:1, 1991
32. Markowitz D, Goff S, Bank A: A safe packaging line for gene transfer : separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 62:1120, 1988
33. Chen JH: Cloning, sequencing, and expression of mouse c-ets-1 cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene Res.* 5:277, 1990
34. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, Jackson V, Hamada H, Pardoll D, Mulligan RC: Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti tumor immunity. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90:3539, 1993

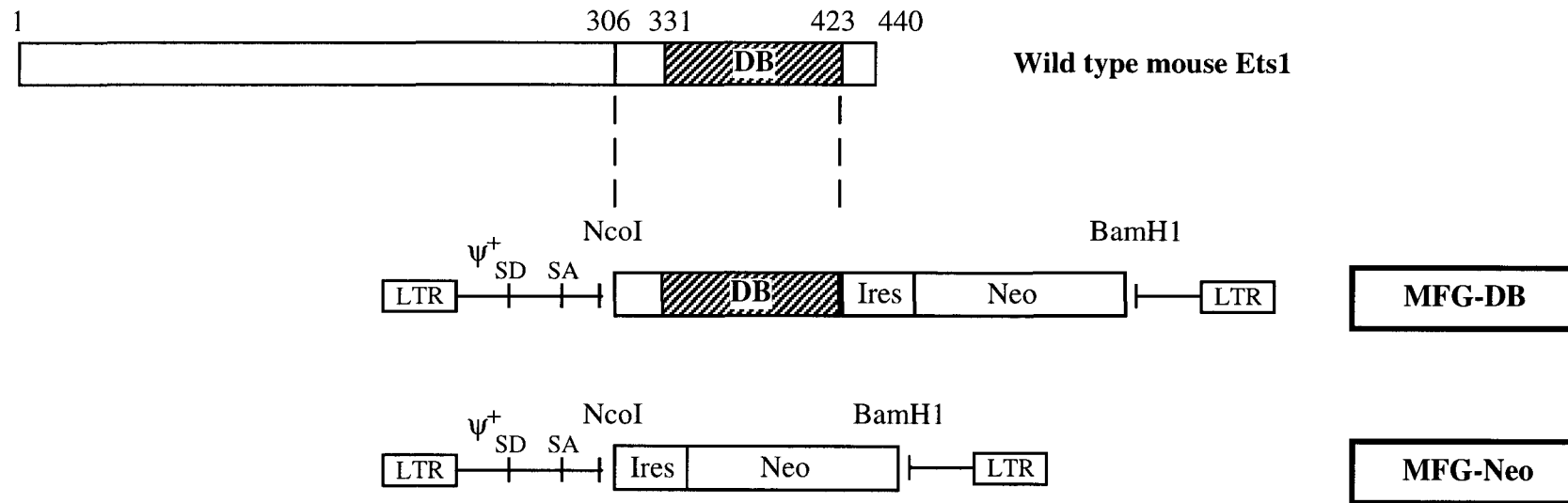
35. Soudant N, Albagli O, Dhordain P, Flourens A, Stéhelin D, Leprince D: A residue of the ETS domain mutated in the *v-ets* oncogene is essential for the DNA-binding and transactivating properties of the ETS-1 and ETS-2 proteins. *Nucleic Acids Res.* 22:3871, 1994
36. Galang CK, Der CJ, Hauser CA: Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* 9:2913, 1994
37. Gilles F, Raes MB, Stéhelin D, Vandebunder B, Fafeur V: The *c-ets-1* proto-oncogene is a new early response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 222:370, 1996
38. Mattot V, Raes M, Henriot P, Eeckhout Y, Stéhelin D, Vandebunder B, Desbiens X: Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell Sci.* 108:529, 1995
39. Boulukos KE, Pognonec P, Rabault B, Begue A, Ghysdael J: Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 9:5718, 1989
40. Kubota Y, Kleinman HK, Martin GR, Lawley TJ: Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell. Biol.* 107:1589, 1988
41. Hierck BP, Poelmann RE, van Iperen L, Brouwer A, Gittenberger-De Groot AC: Differential expression of $\alpha 6$ and other subunits of laminin binding integrins during development of the murine heart. *Dev. Dyn.* 206:100, 1996
42. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E: A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* 118:1511, 1992
43. Wasyluk C, Maira SM, Sobieszczuk P, Wasyluk B: Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene* 9:3665, 1994
44. Langer SJ, Bortner DM, Roussel MF, Sherr CJ, Ostrowski MC: Mitogenic signaling by Colony-Stimulating Factor 1 and *ras* is suppressed by the *ets-2* DNA-binding domain and restored by *myc* overexpression. *Mol. Cell. Biol.* 12:5355, 1992
45. Sieweke MH, Tekotte H, Frampton J, Graf T: MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* 85:49, 1996

46. Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y: Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 169:522, 1996
47. Fox PL, Sa G, Dobrowolski SF, Stacey DW: The regulation of endothelial cell mobility by p21 *ras*. *Oncogene* 9:3519, 1994
48. Chen ZQ, Fisher RJ, Riggs CW, Rhim JS, Lautenberger JA: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Research* 57:2013, 1997
49. Grevin D, Chen JH, Raes MB, Stehelin D, Vandenbunder B, Desbiens X: Involvement of the proto-oncogene *c-ets 1* and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation;. *Int. J. Dev. Biol.* 37:519, 1993
50. Remy P, Senan F, Meyer D, Mager AM, Hindelang C: Overexpression of the *Xenopus XI-fli* gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 40:577, 1996
51. Gumbiner BM: Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84:345, 1996
52. Hall DE, Reichardt LF, Crowley E, Holley B, Moezzi H, Sonnenberg A, Damsky CH: The $\alpha 1/\beta 1$ and $\alpha 6/\beta 1$ integrin heterodimers mediate cell attachment to distinct sites on laminin. *J. Cell Biol.* 110:2175, 1990
53. Kramer RH, Cheng YF, Clyman R: Human microvascular endothelial cells use $\beta 1$ and $\beta 3$ integrin receptor complexes to attach to laminin. *J. Cell Biol.* 111:1233, 1990
54. Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA: Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* 264:569, 1994
55. Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA: Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79:1157, 1994
56. Sage EH, Bornstein P: Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. *J. Biol. Chem.* 266:14831, 1991
57. Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rüdiger M, Schlüter K, Stanke G, Winkler J: The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11:379, 1995

58. Grant DS, Kleinman HK: Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* 79:317, 1997
59. Grant DS, Lelkes PI, Fukuda K, Kleinman HK: Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27:327, 1991
60. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A: Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk1 mutant. *Nature* 367:576, 1994



Figure 1 (Mattot et al)



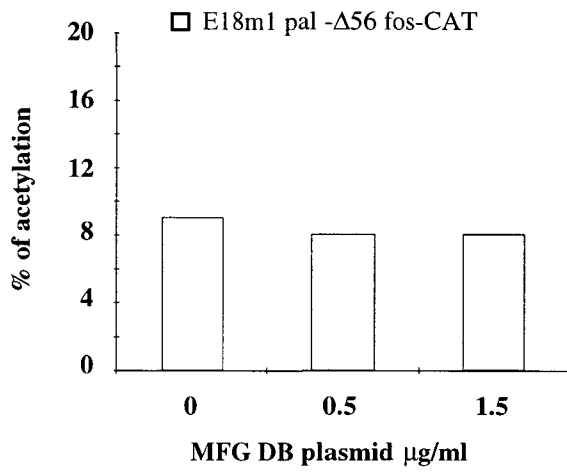
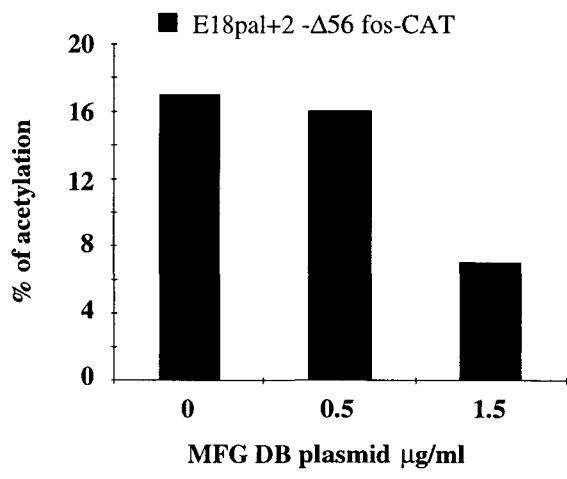
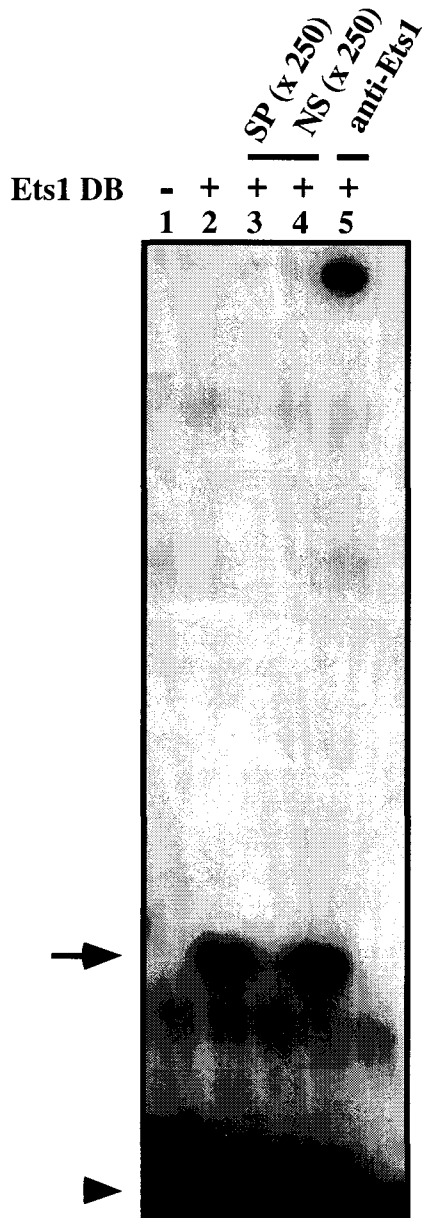


Figure 2 (Mattot et al)

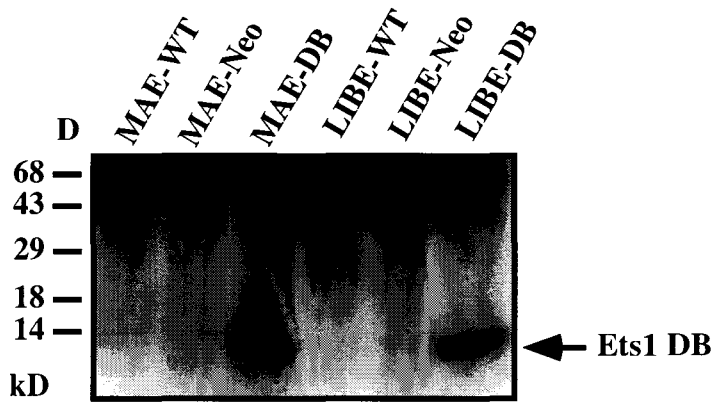
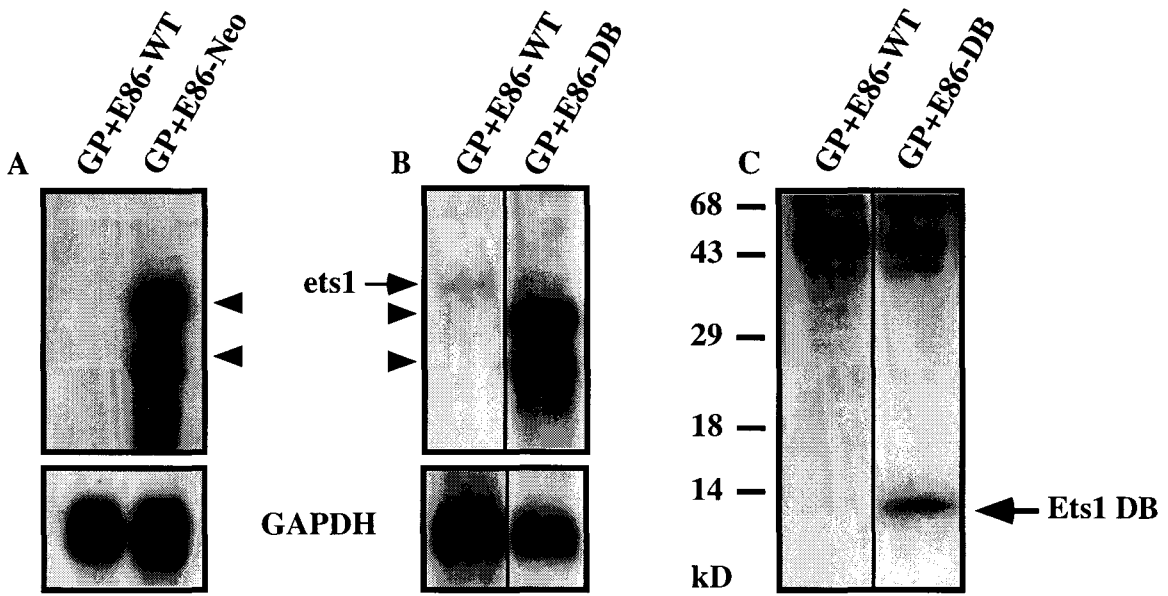
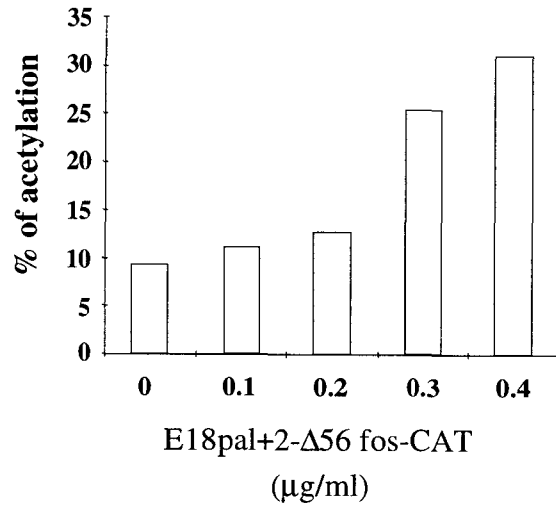


Figure 3 (Mattot et al)

A

MAE Ires Neo



B

MAE DB

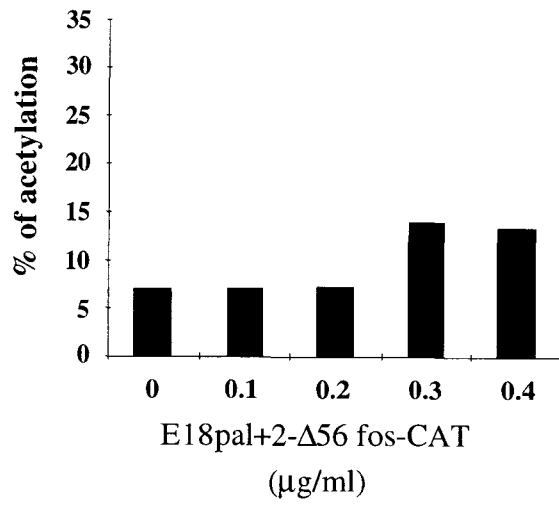


Figure 4 (Mattot et al)

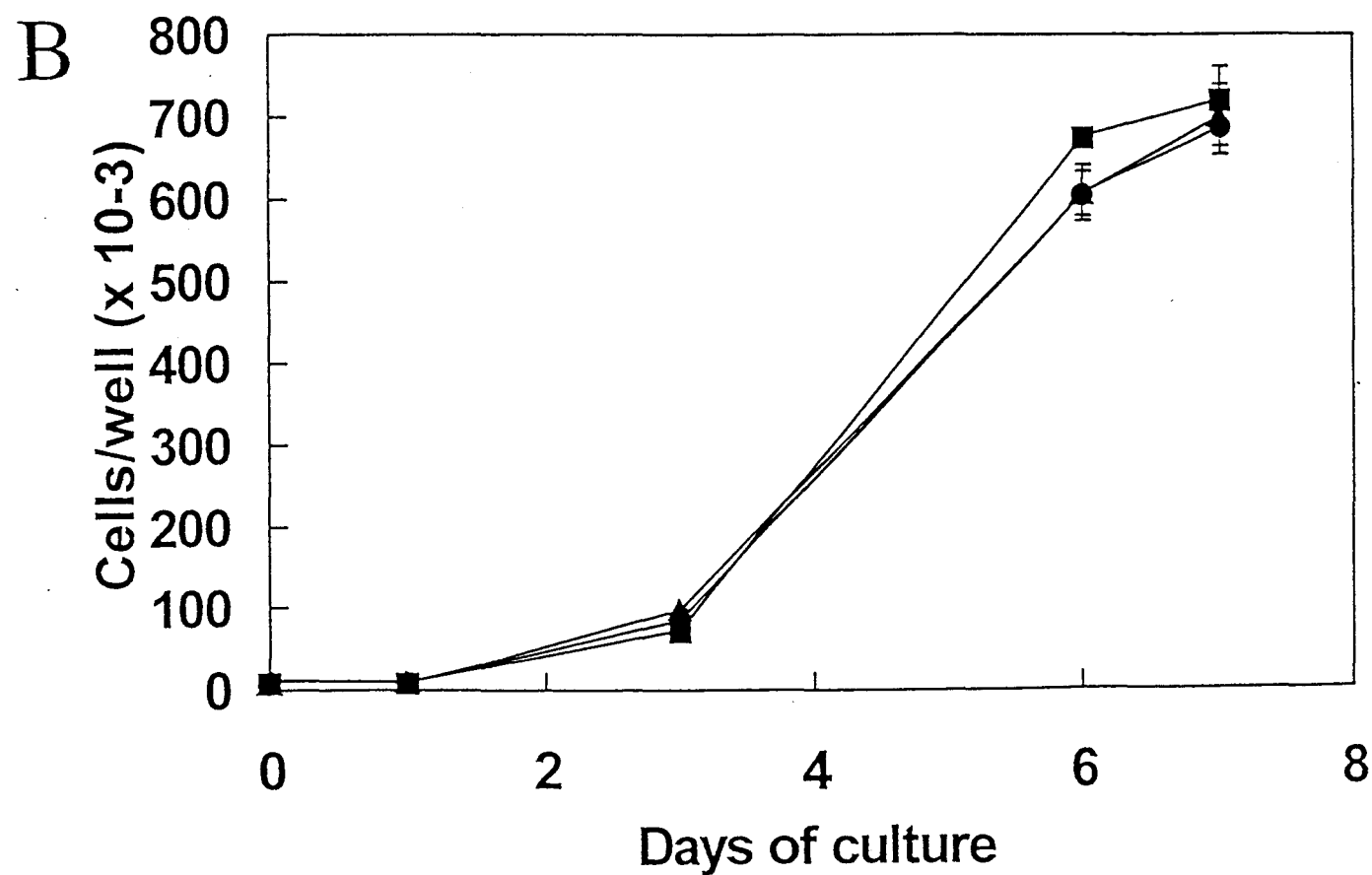
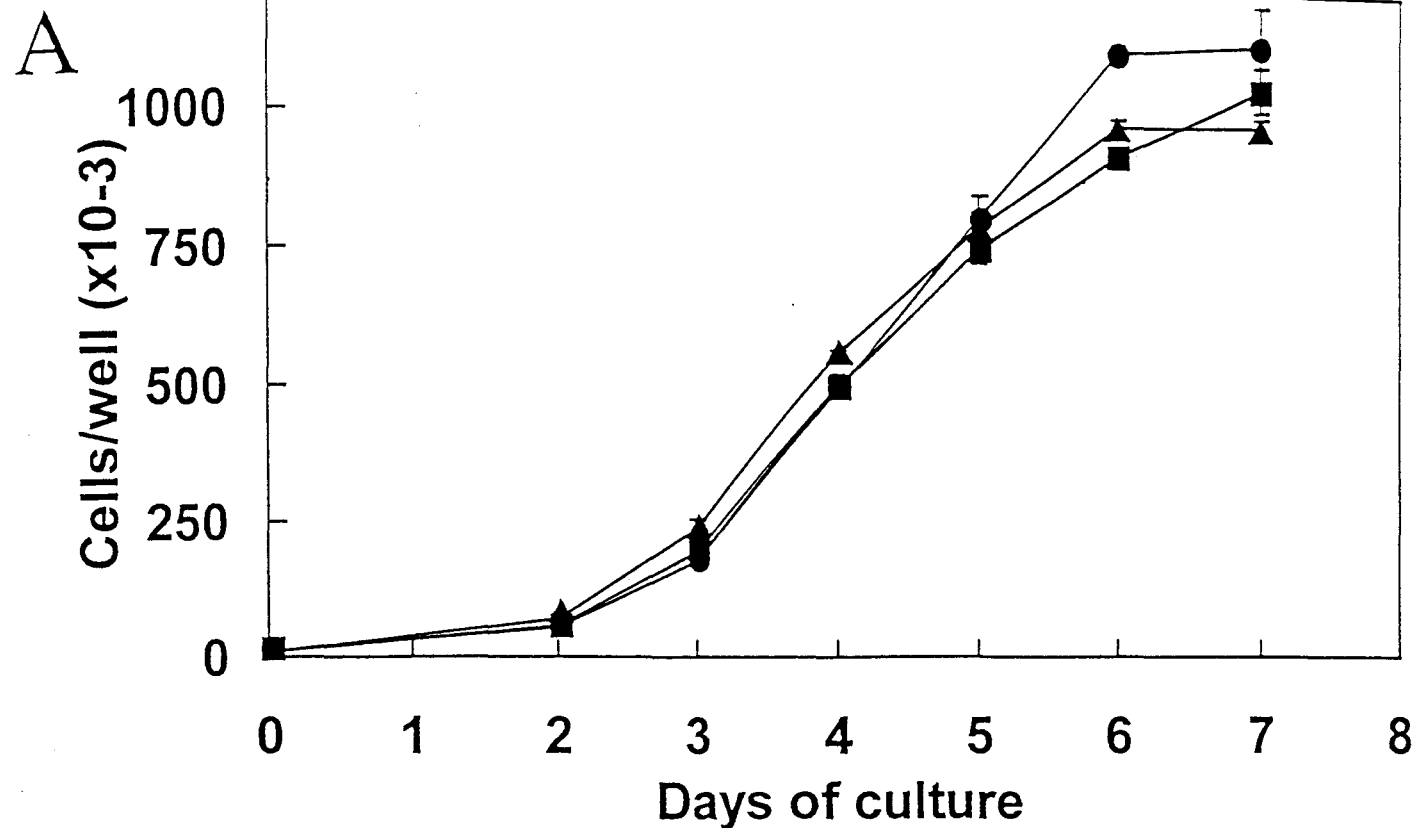
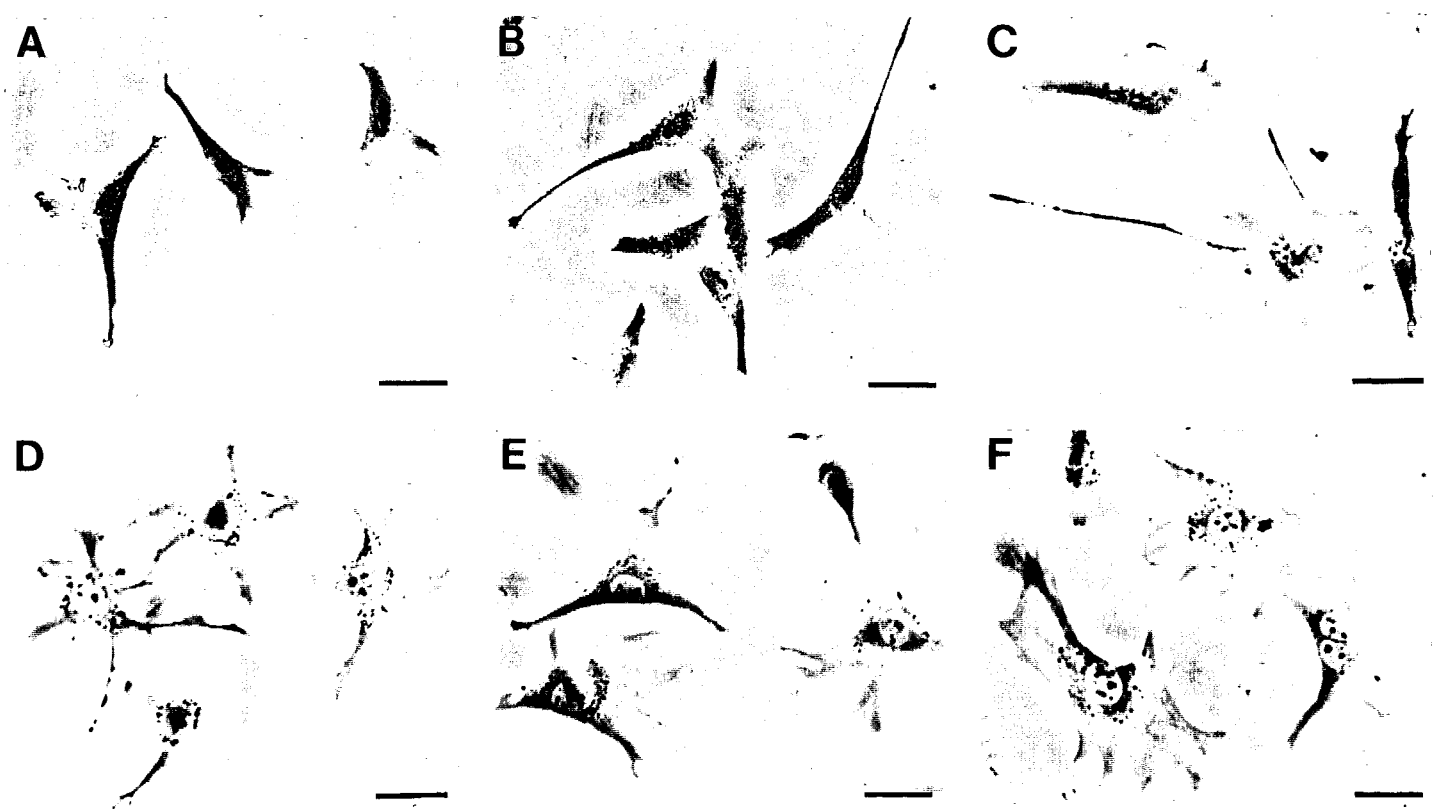


Figure 5 (Mattot et al)



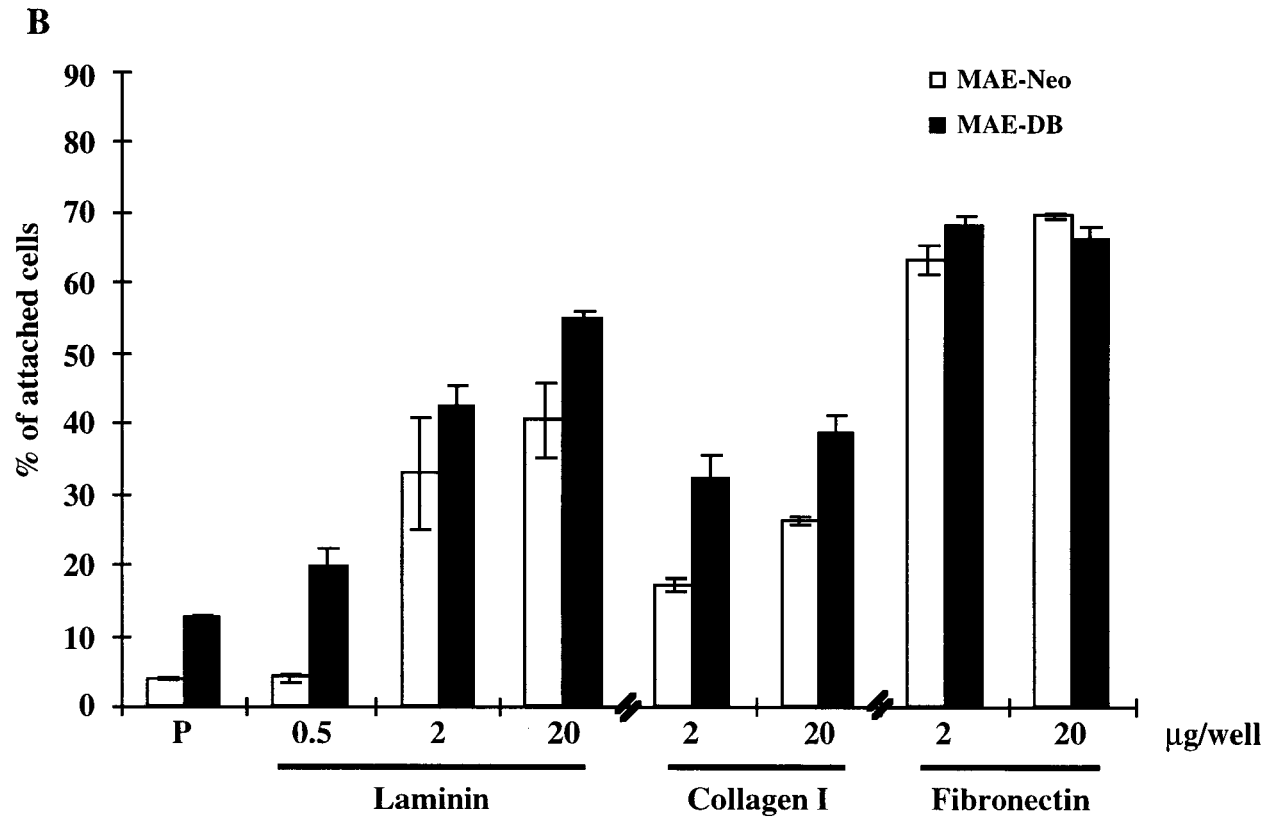
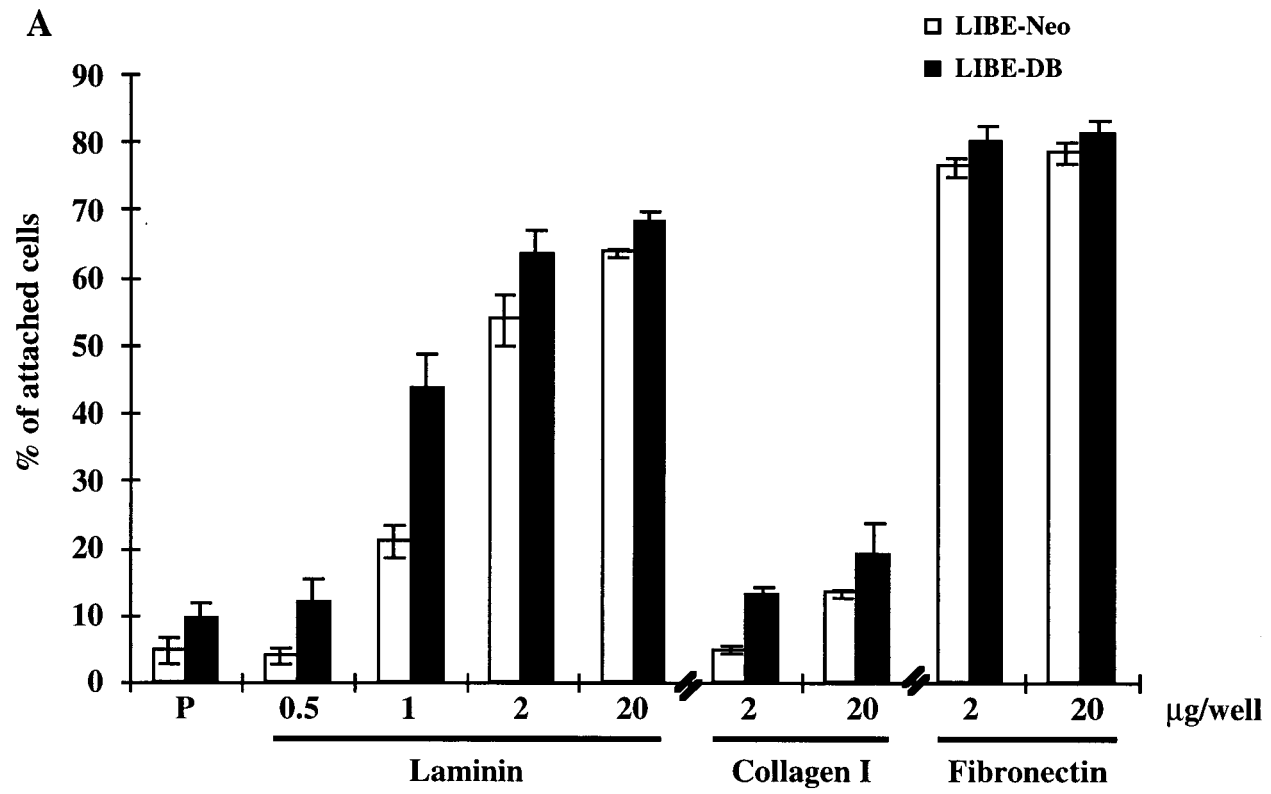
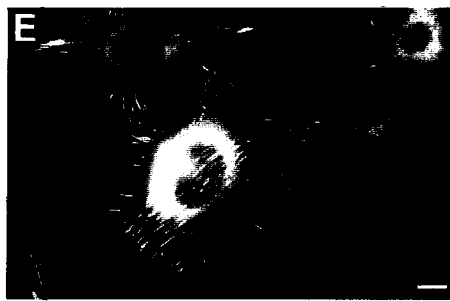
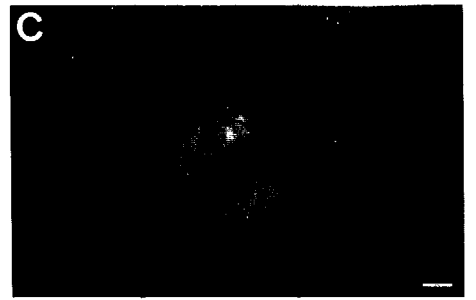
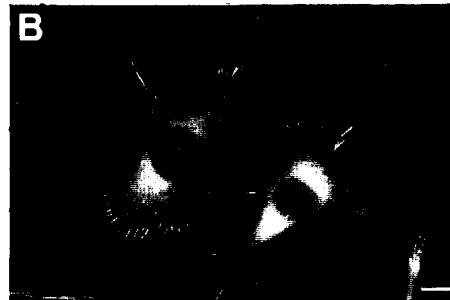
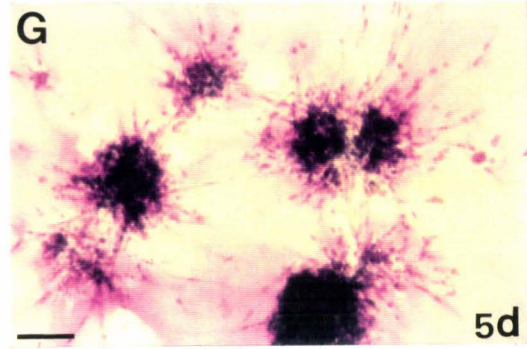
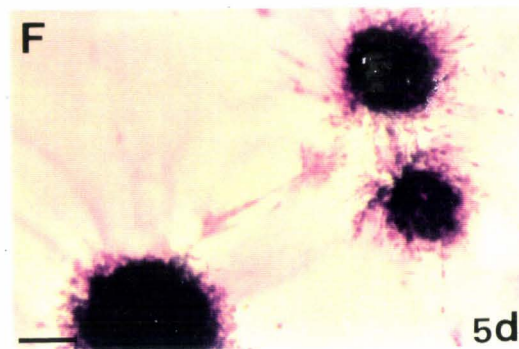
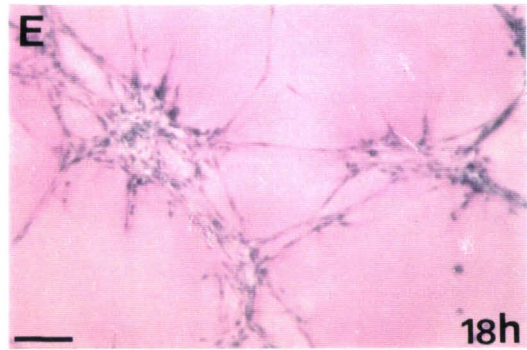
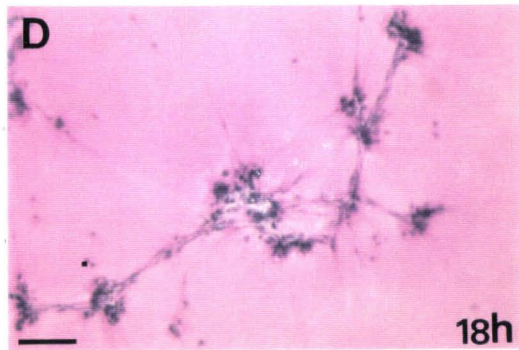
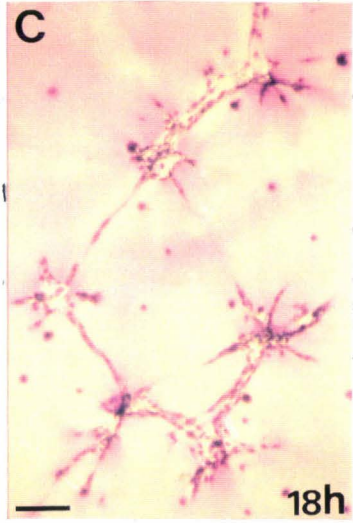
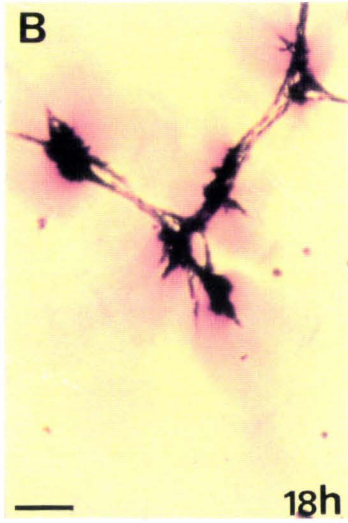
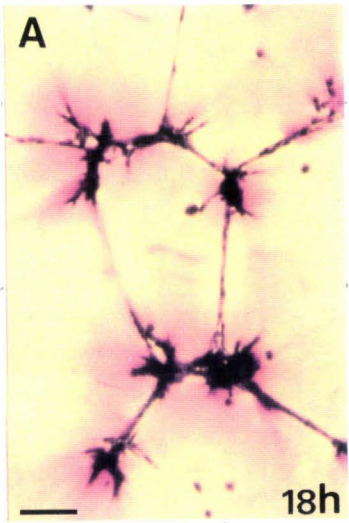


Figure 7 (Mattot et al)





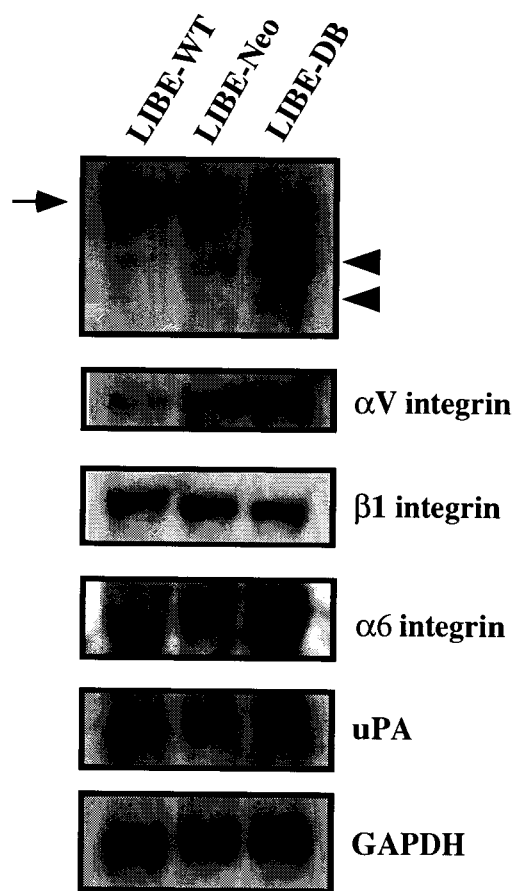


Figure 10 (Mattot et al)

Discussion

1. Le choix des outils

Au début de cette étude, trois choix fondamentaux ont été faits : le choix du vecteur qui allait servir à exprimer le dominant négatif dans les cellules endothéliales, le choix du dominant négatif lui-même et enfin, le choix des cellules endothéliales qui allaient être à la base de notre analyse.

Le choix du vecteur permettant l'expression du mutant dominant négatif de Ets1 dépendait des conditions expérimentales dans lesquelles nous désirions l'utiliser. Si nos objectifs immédiats étaient d'exprimer le mutant *in vitro* dans les cellules endothéliales qui sont dans l'ensemble plutôt réfractaires aux techniques classiques de transfert de gène (comme la transfection), à long terme, nous envisagions d'utiliser ces vecteurs dans des modèles d'angiogenèse *in vivo* (voir deuxième partie). Quatre méthodes de transfert de gène *in vivo* et notamment dans le système vasculaire sont déjà employées : le transfert direct d'ADN, les liposomes, les rétrovirus et les adénovirus (revue (Finkel and Epstein, 1995; Nabel et al., 1991)). Notre choix s'est porté sur les rétrovirus dont le principal avantage est de maintenir à long terme l'expression du gène transféré suite à son intégration au génome cellulaire (Finkel and Epstein, 1995). Cet avantage est d'autant plus important dans notre modèle puisque nous n'avons que peu d'informations sur l'étape précise où les facteurs de transcription Ets peuvent être impliqués. Le succès de notre entreprise dépendait principalement d'une expression convenable et durable du mutant pour favoriser au maximum son effet pendant le processus angiogénique. Les autres techniques ne présentaient pas cet avantage. Le transfert direct de l'ADN ou incorporé dans les liposomes est peu efficace *in vivo* et même *in vitro* (Finkel and Epstein, 1995). Les adénovirus infectent tous types de cellules (en prolifération ou quiescentes) mais du fait d'une non intégration au génome cellulaire, l'expression de la protéine mutante aurait été rapidement perdue au cours de la prolifération des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse.

Les virus produits par les cellules d'encapsulation spécialement choisies pour éviter les recombinaisons et la production de virus sauvages (Markowitz et al., 1988) ont un titre élevé et infectent efficacement les cellules endothéliales (80% contre quelques pour cent dans le cas d'une simple transfection). Pour éviter des interférences dans nos analyses dues aux effets du site d'intégration du rétrovirus, nous avons réalisé toute cette étude sur des populations cellulaires et non pas sur des clones isolés où un site unique d'intégration aurait été privilégié. L'expression du mutant dominant négatif semble convenable à la fois en Northern blot et en immunoprécipitation

mais il faut toutefois noter qu'elle est déterminée sur une population hétérogène dans laquelle l'activité du promoteur viral peut varier d'une cellule à l'autre.

Le choix du mutant dominant négatif de Ets1 repose sur les connaissances des domaines régulateurs du facteur de transcription. Naïvement, on peut considérer qu'un dominant négatif pour un facteur de transcription est compétent s'il se lie efficacement à l'ADN, empêchant ainsi la fixation et l'activité de protéines endogènes spécifiques. Le dominant négatif a donc été conçu à partir du domaine de fixation à l'ADN de Ets1 sans l'extrémité carboxy-terminale connue pour inhiber la fixation de Ets1 à l'ADN (Hagman and Grosschedl, 1992). De plus cette extrémité carboxy-terminale maintenue dans la construction d'un dominant négatif aviaire semble avoir un effet toxique sur les cellules (Wasylyk et al., 1994). En partie amino-terminale, la délimitation du mutant dominant négatif de Ets1 (à l'acide aminé 306) ne correspond pas à l'extrémité du domaine de fixation à l'ADN au sens strict (localisé à l'acide aminé 331). Elle dépasse donc la limite du domaine de fixation à l'ADN de 25 acides aminés supplémentaires. Ce choix dérive de travaux précédents utilisant un dominant négatif de Ets2 pour étudier le rôle des membres de la famille Ets dans la transduction du signal mitotique médié par CSF-1 (colony stimulating factor) et Ras (Langer et al., 1992). Ce choix s'est avéré judicieux puisque des dominants négatifs de Ets1 aviaires raccourcis dans leur extrémité amino-terminale sont inactifs dans des tests de transactivation (Wasylyk et al., 1994).

Les capacités de Ets1-DB à se lier à l'ADN et à inhiber l'activité des membres endogènes de la famille Ets ont été vérifiées sur des vecteurs rapporteurs artificiels (Galang et al., 1994) par transfection transitoire. Il est décevant de constater que l'expression de Ets1-DB n'induit qu'une réduction de 50% de l'activité des membres endogènes de la famille Ets. Les mécanismes d'action de ce mutant sont tellement complexes que plusieurs hypothèses permettent d'expliquer cette inhibition relativement moyenne. L'expression du dominant négatif bien qu'elle soit facilement détectable dans nos expériences d'immunoprécipitation, pourrait ne pas être encore suffisante pour saturer les sites de fixation pour le facteur de transcription. D'autre part, le mutant dominant négatif est également susceptible d'interagir avec des partenaires inhibiteurs des protéines Ets endogènes (des cofacteurs pour Ets1 interagissant avec son domaine de fixation à l'ADN sont déjà connus, (Sieweke et al., 1996)). Le mutant ainsi monopolisé ne pourrait plus se fixer à l'ADN et favoriserait de plus l'activité des protéines Ets endogènes en détournant leurs inhibiteurs.

Enfin des contraintes liées à l'utilisation des virus amphotropes (susceptibles d'infecter des cellules de l'expérimentatrice), nous ont conduit à réaliser cette études avec des virus écotropes sur des cellules endothéliales de souris. Plusieurs lignées ont été testées (LIBE, MAE, MHEC5T, des cellules endothéliales dérivées du coeur et transformées spontanément, SMHEC5T, des cellules endothéliales dérivées de micro-capillaires cardiaques). Ces cellules plus où moins sensibles à l'infection ne présentaient pas des caractéristiques identiques. Notre choix s'est porté sur des cellules sensibles à l'infection dont les caractéristiques se conformaient le plus aux propriétés des cellules endothéliales par leurs réponses aux facteurs de croissance et leurs capacités à former des structures ressemblant à des capillaires dans des tests d'angiogenèse *in vitro* (Gualandris et al., 1996; Kanda et al., 1996).

2. La prolifération et la migration des cellules endothéliales ne sont pas affectées par l'expression de Ets1-DB :

Les premières observations corrélant l'expression de *ets1* avec la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Wernert et al., 1992) suggéraient une fonction pour ce facteur de transcription dans la régulation de la multiplication cellulaire. Nous avons montré que le mutant dominant négatif de *Ets1* n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules endothéliales. Un résultat identique a été obtenu avec des oligonucléotides antisens de *ets1* qui n'altère pas non plus la prolifération de cellules endothéliales humaines (Iwasaka et al., 1996). Ces données suggèrent que l'expression de *ets1* est synchronisée avec la prolifération des cellules endothéliales mais que le facteur de transcription ne semble pas prendre part à la régulation du processus. Il faut cependant prendre des précautions pour extrapoler les résultats obtenus avec des lignées cellulaires, puisque ces cellules ont perdu des mécanismes de régulation qui limitent *in vivo* la prolifération des cellules.

Si nos résultats s'accordent avec ceux de Iwasaka et al. en ce qui concerne la régulation de la prolifération cellulaire, en revanche, ils diffèrent particulièrement sur la migration des cellules. L'expression du mutant dominant négatif de *Ets1* n'a pas modifié la migration des cellules endothéliales mesurée après blessure dans un tapis cellulaire confluent. L'administration d'oligonucléotides antisens dirigés contre *ets1* sur des cellules endothéliales humaines provoque une réduction de la migration induite par le FGF1 ou l'EGF (Iwasaka et al., 1996). D'autres auteurs ont démontré que ce type d'antisens inhibe aussi la migration de cellules endothéliales humaines à travers le Matrigel ou la gélatine induite par le VEGF (Chen et al., 1997). Il est évident qu'une comparaison directe de ces résultats n'est pas facile puisque la technique

d'inhibition par des antisens jouant sur l'expression du facteur de transcription est très différente de celle du dominant négatif dont la cible est l'ADN et non pas le facteur de transcription lui-même. S'ajoute à cette différence technique le fait que nos résultats ne tiennent jamais compte de l'influence de facteurs angiogéniques et qu'ils dérivent de blessure dans des tapis confluents de cellules endothéliales mises en culture sur la gélatine.

Nos désaccords se poursuivent en ce qui concerne l'expression de l'uPA qui n'est pas affectée dans les cellules exprimant le dominant négatif alors qu'elle décroît en présence des oligonucléotides antisens dirigés contre ets1 d'après les travaux de ces deux mêmes équipes (Chen et al., 1997; Iwasaka et al., 1996). Iwasaka et ses collaborateurs démontrent également une diminution d'expression de la collagénase interstitielle (MMP-1). Les arguments proposés précédemment permettent à nouveau d'expliquer ces résultats contradictoires. Néanmoins, s'il est intellectuellement satisfaisant de mettre en évidence la réduction d'expression de gènes cibles putatifs pour Ets1 avec des oligonucléotides antisens, ces résultats sont loin d'expliquer la fonction de Ets1 *in vivo* dans la mesure où l'uPA et la collagénase interstitielle ne sont généralement pas exprimées dans les cellules endothéliales au cours du processus angiogénique (Grevin et al., 1993; Mattot et al., 1995; Wernert et al., 1994). D'autre part, les animaux déficients en uPA ne présentent pas de défaut majeur dans leur réseau vasculaire (Carmeliet et al., 1994). La recherche d'une fonction pour les membres de la famille Ets au cours du processus angiogénique reste donc ouverte.

3. L'adhérence des cellules endothéliales est augmentée par l'expression de la protéine Ets1-DB :

Plusieurs de nos résultats convergent pour démontrer que l'expression de Ets1-DB augmente les capacités d'adhérence des cellules endothéliales. D'un point de vue morphologique, un tel étalement des cellules avait déjà été brièvement évoqué après l'expression d'un mutant dominant négatif de Pu.1 dans les fibroblastes transformés par Ras (Wasylyk et al., 1994). Si la concordance de nos résultats est satisfaisante, elle suggère cependant que la fonction des membres de la famille Ets dans la régulation de l'adhérence n'est pas caractéristique des cellules endothéliales. Toutefois, si nous nous attardons un peu plus sur les résultats de Wasylyk et al., nous constatons que l'effet du dominant négatif de Pu.1 pourrait ne pas impliquer les mêmes mécanismes que dans nos observations. En effet, la transformation par Ras entraîne la perte d'inhibition de contact et d'attachement au support et l'expression du dominant négatif de Pu.1 permet aux fibroblastes transformés de retrouver un étalement quasiment identique aux cellules parentales. L'effet du dominant négatif de Pu.1 correspond donc à une situation particulière de

réversion d'une transformation par Ras des cellules. L'étalement des cellules endothéliales que nous avons observé, après expression de la protéine Ets1-DB, ne correspond peut être pas à une réversion de transformation. D'autant plus que les cellules endothéliales LIBE que nous avons utilisées ne présentent pas les caractéristiques de cellules transformées (elles possèdent des inhibitions de contact et elles ne forment pas de clone en agar) (Kanda et al., 1996). De plus, les membres de la famille Ets qui s'expriment dans ces fibroblastes transformés par Ras sont Ets2, GABP, Elk, SAP1 et Net (Giovane et al., 1994).

La surexpression de Fli durant le développement du Xénope entraîne une perte d'adhérence entre les feuillets embryonnaires. Cette perturbation s'accompagne de variations morphologiques des cellules qui deviennent rondes et perdent vraisemblablement leur capacité d'attachement (Remy et al., 1996). Cette fois encore, ces observations ne sont pas typiques des cellules endothéliales, ce qui suggère une fonction de Fli dans la régulation de l'adhérence des cellules en général. Nos résultats s'accordent avec ces travaux ; et il semble à nouveau que les membres de la famille Ets aient une fonction dans la régulation de l'adhérence cellulaire qui ne serait pas spécifique du type cellulaire. Cette non spécificité peut expliquer les difficultés que nous avons rencontré pour identifier une cible moléculaire pour les membres de la famille Ets. En focalisant notre recherche au contexte de l'angiogenèse (par exemple les intégrines αv ou $\beta 3$), nous avons ainsi considérablement réduit notre champ d'investigation.

L'expression de la vinculine décroît au cours de la formation de pseudo-capillaire en gel de collagène (Deroanne et al., 1996) ce qui suggère son implication dans l'angiogenèse. Les variations de répartition de la vinculine, suite à l'expression de la protéine Ets1-DB, sont de ce fait intéressantes. Elles ne sont cependant pas suffisantes pour conclure sur une éventuelle augmentation du nombre de plaques focales d'adhérence. Il serait intéressant de mesurer avec précision les variations du nombre et de la répartition de ces plaques en fonction de l'expression ou non du dominant négatif de Ets1. Une technique de microscopie par réflexion permet de visualiser ces plaques focales d'adhérence qui apparaissent alors comme des taches sombres dans la cellule (exemple (Murphy-Ullrich and Höök, 1989)). Nous pourrions alors conclure précisément quant au rôle joué par le dominant négatif au niveau de ces plaques.

Sur Matrigel, un gel riche en composants de la membrane basale, l'organisation des cellules endothéliales exprimant la protéine Ets1-DB en structures de type capillaires est affectée. Par ces expériences, nous avons finalement démontré que le mutant dominant négatif de Ets1

pouvait perturber les phases finales de formation d'un nouveau vaisseau sanguin, lorsque la membrane basale est déjà existante. Les cellules endothéliales mises en culture sur Matrigel cessent de proliférer, s'alignent et s'organisent rapidement (Grant et al., 1989). Qu'en est-il des phases précoces de l'angiogenèse où les cellules endothéliales prolifèrent et migrent au sein des composants de la matrice extra-cellulaire. Cette question reste encore sans réponse, mais l'étude du comportement des cellules endothéliales exprimant la protéine Ets1-DB est en cours dans des modèles *in vitro* comme les gels de collagène ou de fibrine qui miment les étapes plus précoces de l'angiogenèse.

4. Une adhérence accrue mais une migration non perturbée :

Alors que l'expression de Ets1-DB augmente l'adhérence des cellules endothéliales sur différents substrats, nous n'avons pas observé d'effet de ce mutant sur la migration des cellules. Cette absence d'effet est paradoxal, dans la mesure où la migration cellulaire est médiée par les récepteurs d'adhérence qui relient la cellule à la matrice extra-cellulaire, transmettant les forces et les signaux nécessaires à la locomotion. Cependant, cette migration nécessite des interactions dynamiques entre les récepteurs d'adhérence et la matrice, un subtil équilibre entre un gain d'adhérence des cellules au front de migration et plus particulièrement au niveau des lamellipodes et une perte d'adhérence en arrière de ce front pour permettre un mouvement à la cellule sans perdre le contact avec son support (revue (Lauffenburger and Horwitz, 1996)). La migration cellulaire implique donc une polarité « morphologique » des cellules où les lamellipodes et les filopodes représentent le front de migration diamétralement opposé à la zone de rétraction. Au cours de la migration, des réarrangements du cytosquelette sont également nécessaires notamment des dépolymérisations et repolymérisations de l'actine ainsi que des remaniements de leurs contacts avec la membrane faisant appel aux protéines de pontage (revue (Lauffenburger and Horwitz, 1996)). Dans les cellules exprimant Ets1-DB, les lamellipodes sont présents sur toute la périphérie de la cellule et le cytosquelette est désorganisé.

Avant de tirer une conclusion définitive sur ces effets surprenants du dominant négatif de Ets1 qui perturbe la morphologie et l'organisation de leur cytosquelette sans affecter leur capacité migratoire, il faut réaliser d'autres expériences. A ce sujet, une étude de la migration cellulaire devrait être entreprise sur différents supports (par exemple la laminine où nous avons observé les effets sur l'adhérence) en mesurant par video-microscopie la vitesse de chaque cellule.

5. Des cellules susceptibles d'apporter encore de nombreuses informations

Si des améliorations peuvent être apportées sur le choix des cellules (en utilisant par exemple des cellules primaires), les LIBE-DB et MAE-DB peuvent encore être source d'informations intéressantes. Nous avons déjà évoqué l'importance de mieux caractériser leur capacité migratoire, d'analyser leur comportement au sein de la matrice extra-cellulaire ; il serait aussi instructif de définir leur réponse à divers facteurs angiogéniques. Puisque l'expression de *ets1* est différenciellement contrôlée par des facteurs angiogéniques (EGF, aFGF, bFGF, VEGF, TNF α ,) dans les cellules endothéliales (Chen et al., 1997; Ishikawa et al., 1989) et que *Ets1* stimule lui même son propre promoteur (Chen and Wright, 1993; Oka et al., 1991), la protéine *Ets1-DB* pourrait interférer spécifiquement avec la réponse transcriptionnelle induite par ces facteurs.

Ces cellules pourraient également nous permettre de rechercher des gènes cibles pour les membres de la famille *Ets*. Par la technique de DD-RT-PCR (*differential display reverse transcription polymerase chain reaction*), déjà fructueuse pour identifier la vimentine comme gène cible de PEA3 dans des cellules épithéliales (Chen et al., 1996), des gènes dont l'expression a été modifiée suite à l'expression du dominant négatif de *Ets1* pourraient être caractérisés.

2^{ème} partie

Deuxième partie :

L'utilisation des outils rétroviraux dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* nous paraissait intéressante pour étudier l'effet du mutant dominant négatif dans un contexte « normal » d'angiogenèse avec des cellules endothéliales possédant la capacité de répondre aux facteurs angiogéniques, et exprimant les molécules d'adhérence et de jonctions intercellulaires. Il faut en effet noter que certaines de ces molécules ne s'exprimaient pas dans les cellules endothéliales que nous avons utilisé *in vitro*, et notamment la VE-Cadhérine.

Des cellules cancéreuses humaines et les cellules d'encapsidation produisant les rétrovirus ont donc été injectées en sous-cutané chez des souris SCID. De cette façon, ont été produits *in situ* des rétrovirus contrôlant l'expression du gène de la β galactosidase, du gène de sélection à la néomycine ou de la construction codant la protéine Ets1-DB. Les cellules cancéreuses utilisées dans ce modèle sont des cellules humaines et ne sont donc pas susceptibles d'être infectées par les rétrovirus écotropes produits par les cellules d'encapsidation. Les rétrovirus sont donc entièrement destinés à infecter les tissus dérivés de la souris à savoir le stroma tumoral (par exemple les fibroblastes, les cellules endothéliales). Les résultats préliminaires issus de ces travaux sont présentés et discutés.

D'autre part, deux nouveaux rétrovirus sont actuellement disponibles et permettront peut être de préciser plus particulièrement une fonction pour Ets1 lui même au cours du processus angiogénique. Ils sont décrits et caractérisés à la fin de cette deuxième partie.

I. L'utilisation des rétrovirus dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* :

Matériel et méthodes :

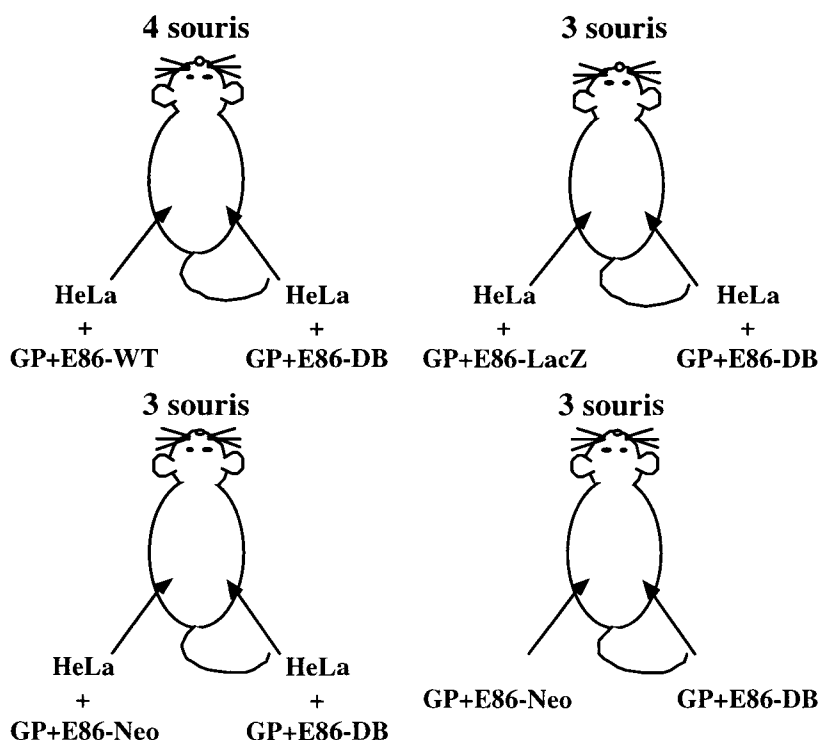
Culture cellulaire :

Les cellules d'encapsidation (GP+E86-WT, GP+E86-Neo, GP+E86-DB et GP+E86-LacZ) sont cultivées en milieu DMEM en présence de 10% de sérum de veau, de pénicilline (50U/ml), de streptomycine (50µg/ml) et de gentamycine (8µg/ml). Les cellules GP+E86-LacZ produisent un rétrovirus dont le génome contient le gène de la β galactosidase. Par révélation de l'activité enzymatique de la β galactosidase, les zones d'infection sont facilement repérables.

Les cellules cancéreuse HeLa sont cultivées en milieu DMEM en présence de 10% de sérum de veau fœtal, de pénicilline (50U/ml), de streptomycine (50µg/ml) et de gentamycine (8µg/ml).

Injection des souris SCID :

Après trypsinisation, les cellules sont comptées (Compteur Coulter) et mises en suspension en DMEM à raison de 1.10^6 cellules HeLa et 10.10^6 cellules d'encapsidation dans 500µl pour une injection. Les injections sur les flancs des souris sont réalisées suivant le programme suivant :



Evaluation du volume tumoral :

Au cours de l'expérience, le volume des tumeurs a été évalué en mesurant 5 jours, 8 jours et 12 jours après l'injection la longueur (L) et la largeur (l) de la tumeur et estimé en assimilant la tumeur à une ellipsoïde.

$$\text{Volume (mm}^3 \text{ ou mg)} = \frac{1}{2} (L \times l^2)$$

Northern blot :

Des échantillons de tumeurs ont été prélevés, 8 jours et 12 jours après injection et juste avant inclusion en paraffine pour en isoler les ARNm totaux. La technique d'extraction décrite dans (Mattot et al., 1995) a été suivie pour extraire les ARNm et pour réaliser le Northern blot. La sonde ets1 déjà décrite dans (Mattot et al, soumis) a été utilisée pour détecter les ARNs cellulaires et viraux.

Révélation de l'activité β galactosidase et inclusion des échantillons :

Après sacrifice des souris, les tumeurs sont disséquées et rincées en PBS. Elles sont ensuite incubées la nuit à 33°C, dans une solution de révélation enzymatique : MgCl₂ (2mM), ferro- et ferricyanure de potassium (5mM), Triton X100 (0.01%), DMSO (3%), Deoxycholate de sodium (0.1%), Xgal (1mg/ml), Nonidet NP40 (1%), en PBS.

Après rinçage en PBS, les tumeurs sont fixées au Carnoy (Chloroforme 3V, éthanol 6V, acide acétique 1V) plusieurs heures. Elles sont ensuite déshydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentration croissante puis incluses en paraffine. Les coupes sont ensuite réhydratées et contre-colorées par la coloration de Papanicolaou.

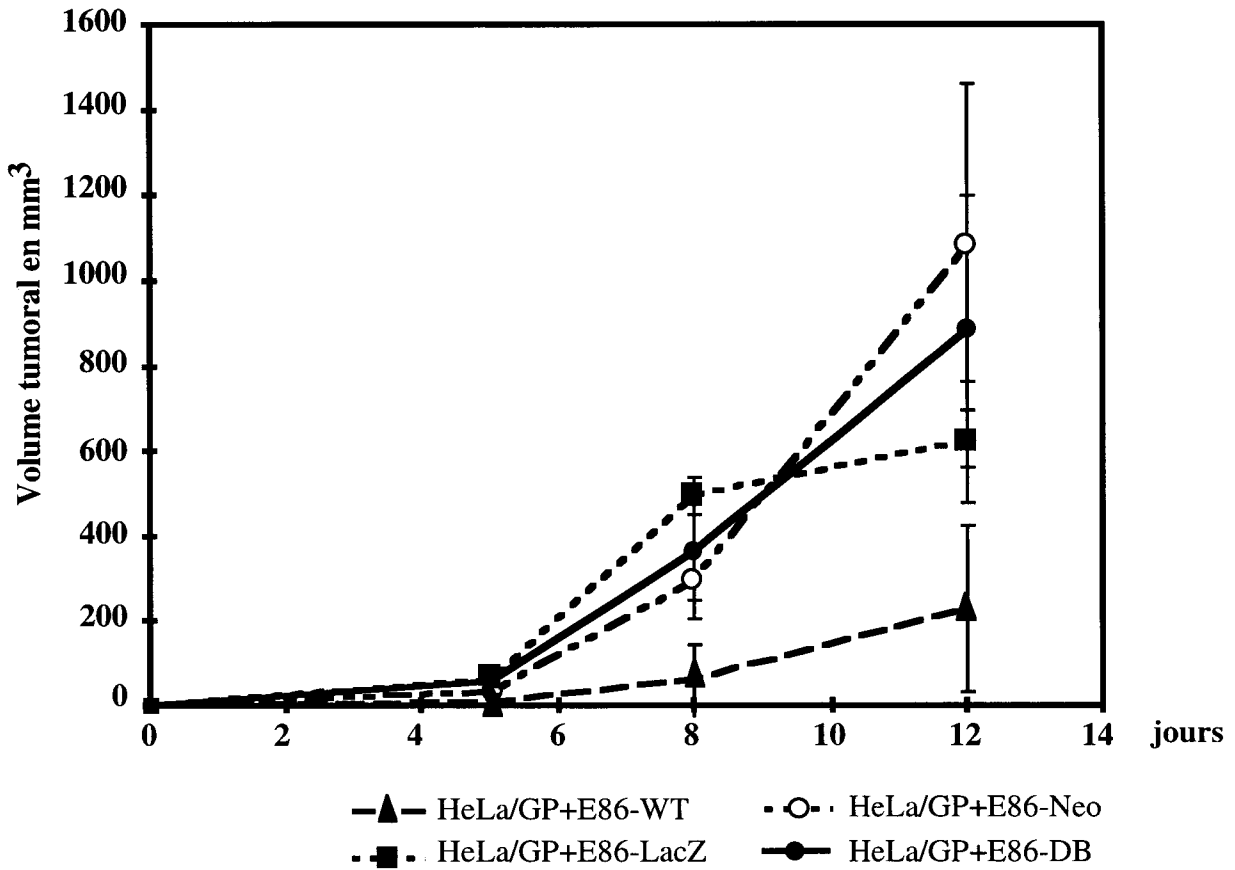
Les tumeurs issues de l'injection des cellules HeLa et des GP+E86-LacZ ont subi cette révélation ainsi que des tumeurs sans activité β galactosidase qui ont servi de contrôle à nos expériences.

Résultats

La croissance des tumeurs au cours de l'expérience :

Trois phases de croissance ont été observées (Figure 13,A). Une phase lente entre le jour de l'injection et le 5^{ème} jour de développement est suivie d'une première accélération de croissance entre le 5^{ème} et le 8^{ème} jour et enfin d'une seconde accélération entre le 8^{ème} et le 12^{ème} jour de développement des tumeurs. Il faut aussi noter que les cellules d'encapsidation injectées seules sur le flanc de la souris ont également formé des tumeurs.

A



B

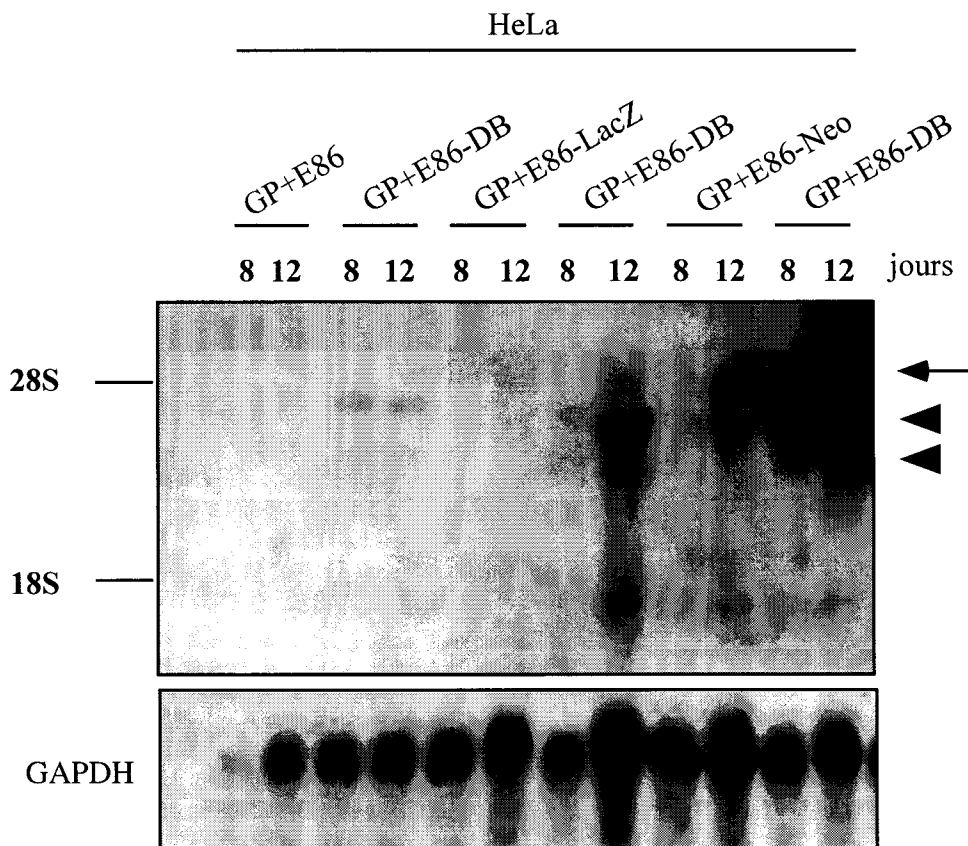


Figure 13 : La croissance des tumeurs et l'expression des transcrits viraux MFG-DB

Le volume tumoral a été calculé après mesure des dimensions des tumeurs 5, 8 et 12 jours après injection (A). Par Northern Blot, les transcrits viraux ont été détectés avec une sonde etsI (B, têtes de flèches); les transcrits endogènes de etsI sont également détectés (B, flèche).

La croissance des tumeurs dans lesquelles les virus MFG-DB sont produits, est similaire voire même supérieure à celles des tumeurs contrôles (sans virus ou avec les virus MFG-Neo, MFG-LacZ).

L'expression générale des rétrovirus :

L'analyse par Northern blot permet de détecter dans les tumeurs infectées les transcrits viraux MFG-DB au moyen d'une sonde ets1. Globalement, l'expression des transcrits viraux est très variable d'un échantillon à l'autre (Figure 13, B).

Analyse macroscopique des tumeurs :

Juste après dissection des tumeurs, l'aspect macroscopique a été analysé à la loupe binoculaire. Aucune variation évidente n'est apparue entre les tumeurs ; en particulier, elles semblent toutes vascularisées de la même façon (Figure 14, A-D, flèches).

Figure 14: Analyses macroscopique et microscopique des tumeurs

Les tumeurs HeLa/GP+E86-Neo (A), HeLa/GP+E86-LacZ (B) et HeLa/GP+E86-DB (C,D) sont toutes trois vascularisées (Flèche et tête de flèche)

Après révélation de l'activité β galactosidase et réalisation de coupes, des champs différents ont été observés où aucune infection n'est visible (E), ou seules quelques zones sont infectées (F) ou une majorité de cellules sont infectées (G). Des vaisseaux sont localisés dans des zones infectées ou non (H,I). Des cellules endothéliales ont été infectées dans ce modèle (J).

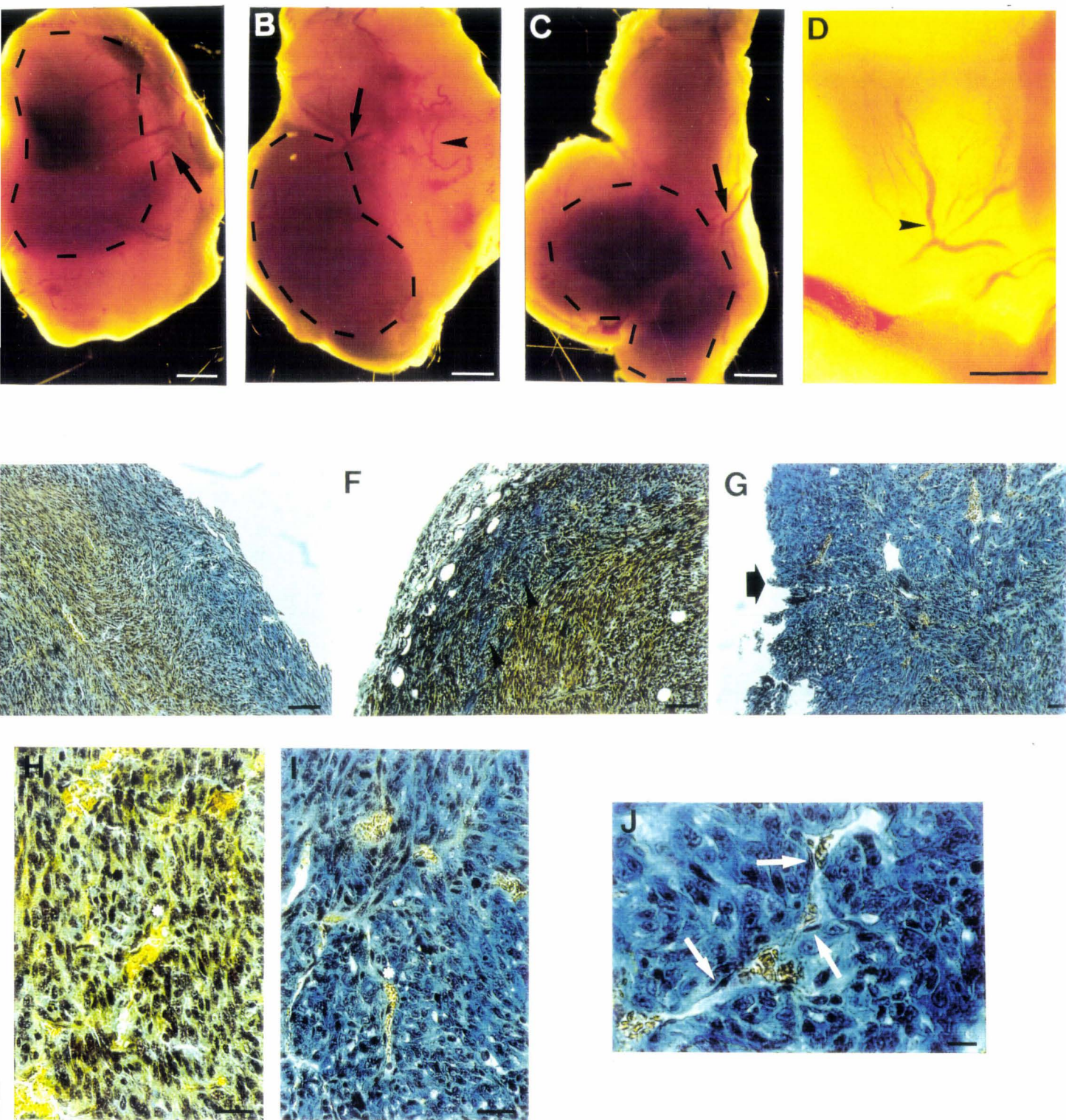


Figure :

Analyse microscopique des tumeurs HeLa/GP+E86-LacZ :

L'analyse détaillée de ces tumeurs a permis d'estimer rapidement l'efficacité d'infection et surtout de déterminer les types cellulaires atteints.

A faible grossissement, différents champs sont observables. Ceux où aucune activité de la β galactosidase n'a été révélée (Figure 14, E), ceux où des activités ponctuelles ont été mises en évidence (Figure 14, F) et ceux où une activité très importante a été détectée (Figure 14, G). Dans tous les cas, l'activité de la β galactosidase ainsi détectée est localisée à la périphérie de la coupe de la tumeur et très rarement au coeur du tissu tumoral.

Des vaisseaux sanguins ont pu être repérés du fait de la coloration en orange des érythrocytes (Figure 14, H,I, étoile) suite à la contre-coloration. Certains vaisseaux sont situés dans des zones où aucune activité de la β galactosidase n'a été détectée (Figure 14, H), d'autres sont localisés au sein même des zones où une intense activité de l'enzyme est visualisée (Figure 14, I). Dans ces zones précisément, une activité de la β galactosidase a pu être détectée dans les cellules endothéliales (Figure 14, J).

Discussion :

Des croissances tumorales identiques :

La croissance tumorale en trois phases que nous avons observée est similaire à celle décrite par une autre équipe qui a déjà utilisé ce modèle (Millauer et al., 1994). Millauer et ses collaborateurs montrent que les tumeurs dérivées de l'injection de cellules de glioblastome et de cellules produisant divers rétrovirus ont une première phase de croissance entre 0 et 10 jours qui correspond à la « prise » de la tumeur, puis une phase plus rapide entre 10 et 15 jours et enfin une nouvelle phase d'accélération entre 15 et 20 jours.

Quels que soient les rétrovirus produits au sein de la tumeur en développement par les cellules d'encapsulation injectées, aucune différence de croissance tumorale n'a été observée. Ces résultats décevants ne nous permettent cependant pas de conclure sur l'absence d'effet du dominant négatif de Ets1 dans le développement tumoral. A ce stade de l'analyse, aucune information n'est connue sur le taux de réussite de l'infection ni sur les cellules infectées.

Les analyses macroscopiques n'ont pas révélé un effet majeur du dominant négatif de Ets1 dans la vascularisation des tumeurs puisque dans tous les cas des vaisseaux sanguins dirigés vers la tumeur ont été observés. Ces résultats ne permettent pas de tirer de conclusion sur l'effet du dominant négatif *in vivo* puisque nous n'avons pas pu estimer les perturbations locales de

l'architecture de l'arbre vasculaire et nous n'avons pas pu observer le phénotype des cellules endothéliales infectées par les virus MFG-DB.

Une expression hétérogène des ARNs viraux :

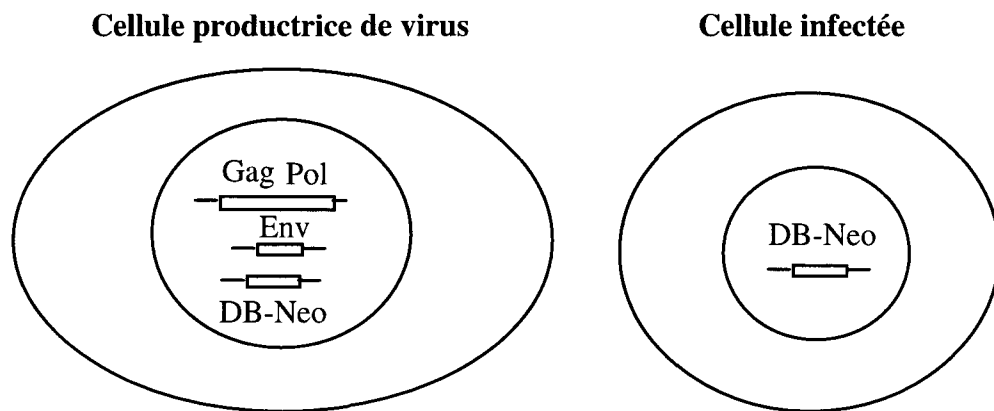
Les résultats de détection des ARNm viraux par Northern blot nous démontrent que d'un échantillon à l'autre, les transcrits viraux codant Ets1-DB ne sont pas exprimés en même quantité. Les échantillons ayant été prélevés sur des tumeurs entières, il se peut que d'un prélèvement à l'autre nous ayons sélectionné des zones plus ou moins infectées. Ce résultat souligne que de telles expériences doivent être analysées statistiquement. Ce Northern blot reste cependant un outil extrêmement précieux car si des travaux conduisent un jour à l'identification de gènes cibles pour les protéines Ets au cours de l'angiogenèse, il sera intéressant de vérifier si la régulation de ces gènes est perturbée par l'expression de dominant négatif.

Des cellules endothéliales sont infectées :

Les analyses microscopiques de l'activité de la β galactosidase démontrent une très grande hétérogénéité de l'infection au sein de la tumeur. Il faut cependant souligner que les zones infectées ne sont observées qu'à la périphérie des échantillons au niveau des coupes ce qui suggère que le substrat n'a pas diffusé au sein du tissu tumoral dense. Il nous faut donc améliorer la technique de révélation de l'activité de la β galactosidase.

Toutefois, des zones où l'efficacité d'infection est importante ont été repérées et des rétrovirus ont infecté des cellules endothéliales.

Si le modèle est prometteur, il ne sera analysable que si une détermination extrêmement précise des zones d'infection est faite. Aucune conclusion ne pourra être tirée si cette condition n'est pas remplie puisque l'éventuel phénotype dû à l'expression du dominant négatif de Ets1 ne pourra être caractérisé que si on repère son lieu d'expression. La technique d'hybridation *in situ*, réalisée avec une sonde Neo permettra d'identifier les zones d'expression virales. Cette même technique réalisée avec une sonde gag, pol ou env (issue des gènes codant les protéines virales) permettra de distinguer les cellules infectées (ne produisant aucune protéine virale puisque le virus est déficient pour la réplication) des cellules productrices exprimant les protéines virales nécessaires à l'encapsidation du virus (Figure 15).



Hybridation in situ	Cellule productrice de virus	Cellule infectée
Sonde Neo	+	+
Sondes Gag, Pol, Env	+	-

Figure 15 : Une technique éventuelle de caractérisation des cellules infectées

Par hybridation in situ, les cellules productrices de virus et infectées seront repérées avec un sonde Neo ; une sonde virale (Gag, Pol ou Env) permettra de différencier les cellules productrices de virus des cellules infectées qui n'expriment pas ces ARNs.

De nombreuses analyses sont encore à réaliser avant de pouvoir conclure sur l'effet du dominant négatif de Ets1. Si ce modèle est susceptible d'apporter des résultats sur l'effet du dominant négatif de Ets1 au cours de l'angiogenèse, il peut également fournir des informations sur l'effet du mutant dans les fibroblastes du stroma tumoral où le facteur de transcription est aussi exprimé.

II. Autres constructions rétrovirales réalisées :

Les vecteurs viraux MFG sont efficaces dans notre système d'étude. C'est pourquoi, nous avons entrepris de réaliser de nouvelles constructions dans ce même vecteur afin de surexprimer Ets dans les cellules endothéliales et de construire un nouveau mutant.

Matériel et Méthodes :

Constructions rétrovirales :

La séquence codant le domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Ets1 (de l'acide aminé 306 à l'acide aminé 440) a été amplifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides : 5' ATC TCG AGA CCA TGG ACT ATG TGC GTG ACC GT 3' et 5' ATC AAT TGT CTA GTC AGC ATC CGG CTT 3'.

Après vérification de l'absence de mutation par séquençage du produit de PCR, ce fragment a été cloné dans le plasmide rétroviral MFG au niveau des sites de clonages NcoI et BamHI et en amont de la séquence IRES Neo (décrite dans Mattot et al soumis), ce nouveau vecteur a été appelé MFG-DBI (pour dominant négatif de longue taille).

Une séquence "Tag" codant 15 acides aminés et correspondant à l'antigène de *Hemagglutinine influenza* a été construite par hybridation *in vitro* des quatre oligonucléotides suivants : 5' CAT CAT GAG CTA CCC TTA 3' ; 5' CGA TGT GCC GGA TTA CGC TAG CCT GGG CCC TGG TAA GGC 3' ; TCG AGT AGT ACT CGA T 3' ; 5' GGG AAT GCT ACA CGG CCT AAT GCG ATC GGA CCC GGG ACC ATT CCG CCG G 3'

Elle a ensuite été clonée en 5' de l'ADNc du gène Ets1 de souris. L'ensemble de la construction a ensuite été introduit dans le plasmide rétroviral MFG en amont de la séquence IRES Neo aux sites de clonages NcoI et BamHI, ce nouveau vecteur a été nommé MFG-TagEts1.

Retard sur gel:

Les protéines recombinantes produites à partir des constructions DBI et TagEts1 clonées dans des plasmides pBluescript (Stratagène) ont été utilisées dans des expériences de retard sur gel. Les sondes spécifiques, les sondes aspécifiques ainsi que la technique expérimentale sont les mêmes que celles décrites précédemment (Mattot et al soumis).

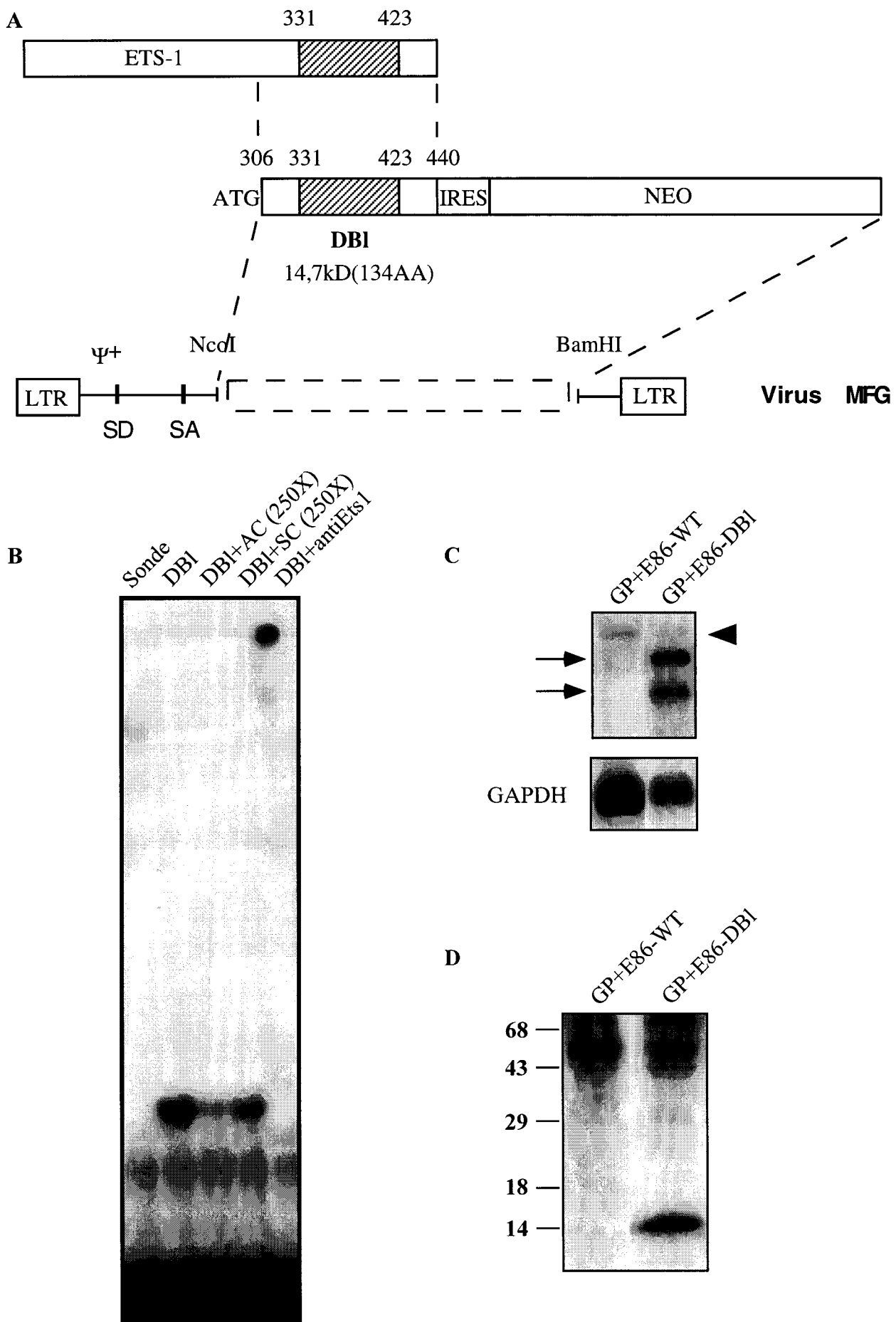


Figure 16: Le retrovirus MFG permettant l'expression de Ets1-DBI

La construction Ets1-DBI (de l'acide aminé 306 à l'acide aminé 440) a été clonée dans le rétrovirus MFG (A). La protéine recombinante Ets1-DBI se fixe à la séquence consensus reconnue par les membres de la famille Ets (B). Les transcrits viraux sont exprimés dans les cellules d'encapsulation (C) ainsi que la protéine Ets1-DBI (D).

Culture cellulaire et transfection :

Les cellules d'encapsulation GP+E86 sont cultivées en DMEM avec 10% de sérum de veau (Hyclone), de la pénicilline (50U/ml) et de la streptomycine (50µg/ml). Les plasmides rétroviraux ont été transfectés dans ces cellules selon la même technique que celle décrite précédemment (Mattot et al soumis). Brièvement, les cellules sont mises en culture en boîte de 10cm² à raison de 150000 cellules par puits puis transfectées le lendemain avec les différentes constructions au moyen de lipofectamine (Gibco). Dans chaque cas, 2µg d'ADN plasmidique et 12µg de lipofectamine dans 1ml d'OptiMEM sont utilisés pour la transfection. Les cellules sont ensuite sélectionnées pour leur résistance à la néomycine durant 15 jours.

Northern blot et immunoprécipitation :

Les mêmes techniques expérimentales que précédemment (Mattot et al soumis) sont reprises pour analyser les populations cellulaires productrices de ces rétrovirus.

Les mêmes sondes ets1 et GAPDH ont été utilisées pour l'hybridation des Northern blot. L'anticorps polyclonal anti-Ets1 est équivalent à celui décrit dans (Gilles et al., 1996) ; Mattot et al soumis). L'anticorps polyclonal anti-Tag est commercialisé par Babco.

Résultats :

Les constructions rétrovirales et les caractéristiques des protéines recombinantes :

La protéine Ets1-DBI correspond à une protéine Ets1 tronquée et réduite au domaine de fixation à l'ADN. Elle diffère de la protéine Ets1-DB décrite précédemment (Mattot et al soumis) dans sa partie carboxy-terminale qui correspond exactement à celle du facteur de transcription Ets1 (Figure 16, A). Dans des expériences de retard sur gel (Figure 16, B), cette protéine mutante se fixe aux séquences d'ADN (EBS, *Ets binding site*) reconnues par les membres de la famille Ets (Laget et al., 1996) et par Ets1-DB qui est tronqué dans sa partie carboxy-terminale (Mattot et al soumis). L'efficacité de fixation à l'ADN de Ets1-DBI ne semble pas différer de celle de Ets1-DB.

La protéine Ets1 fusionnée dans sa partie amino-terminale avec l'antigène de l'*hémagglutinine influenza* (TagEts1, Figure 17, A) a conservé ses capacités à se fixer à des séquences EBS. Cette fixation est spécifique comme nous l'indiquent les compétitions que nous avons réalisées (Figure 17, B). Plusieurs retards de migration de la sonde sont observables sur le gel (Figure 17, B flèches) dus à la synthèse in vitro de plusieurs protéines de tailles variables comme nous l'avons mis en évidence par immunoprécipitation du produit de cette synthèse avec un anticorps anti-

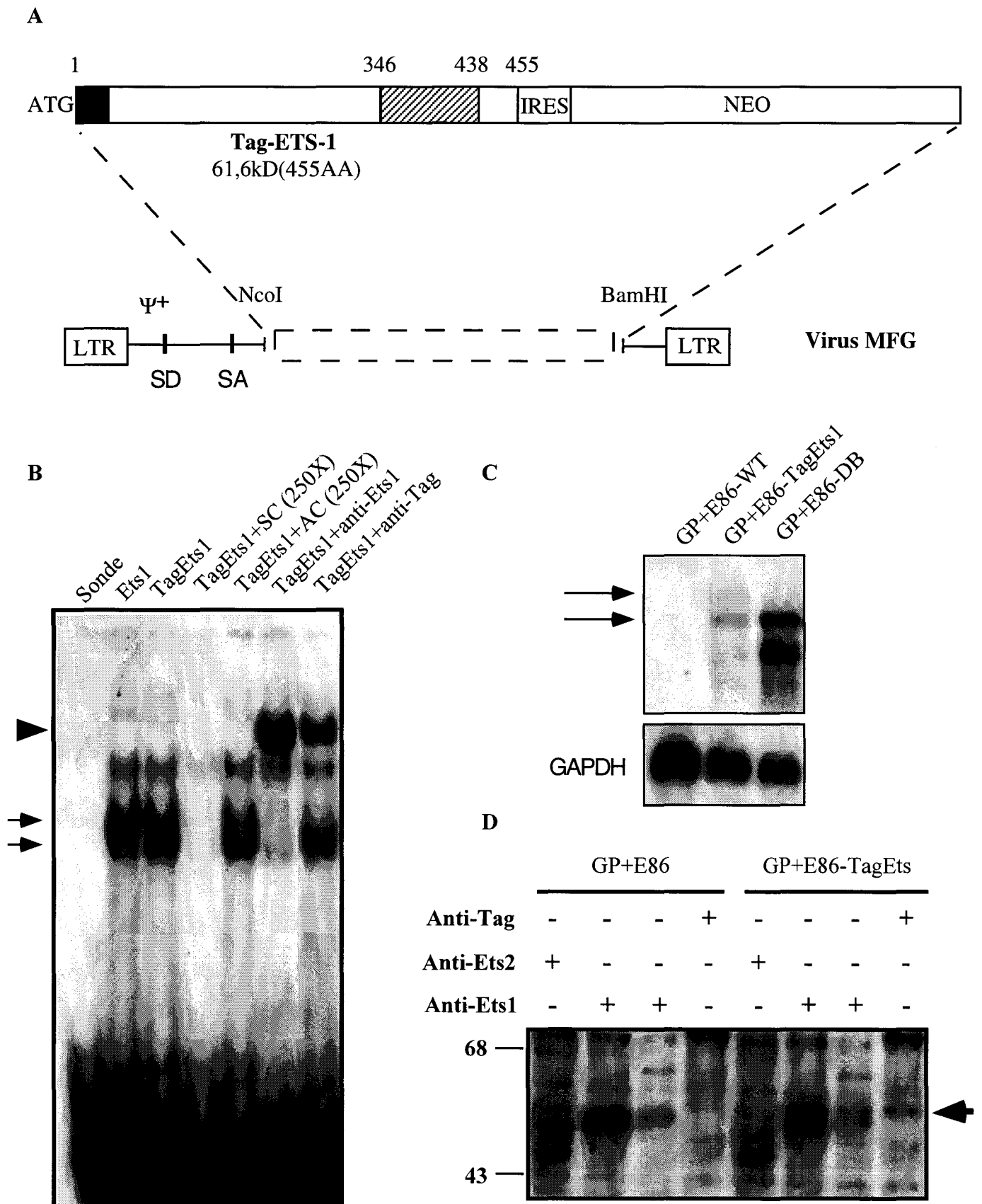


Figure 17 : le rétrovirus permettant l'expression du TagEts1

La construction TagEts1 a été clonée dans le rétrovirus MFG (A).

Les protéines recombinantes fixent la séquence consensus reconnue par les membres de la famille Ets (B). Les transcrits viraux (C) et la protéine TagEts1 (D) s'expriment dans les cellules d'encapsulation.

SC, compétition spécifique; AC, compétition aspécifique

Remarque: les anticorps Anti-Ets1 et Anti-Ets2 sont des anticorps polyclonaux reconnaissant plutôt Ets1 ou Ets2.

Ets1 (résultat non présenté). Plusieurs sites d'initiation de traduction pourraient expliquer l'existence de ces multiples protéines. La présence de ces sites internes d'initiation est d'autant plus plausible qu'un anticorps anti-Tag provoque un retard encore plus important de migration du complexe ADN/protéine (Figure 17, B, tête de flèche) mais que tous les complexes ne sont pas touchés par la présence de cet anticorps.

Les expressions rétrovirales :

Les transcrits rétroviraux sont détectés aux tailles attendues à la fois dans les cellules GP+E86-DBI avec une sonde ets1 et dans les cellules GP+E86-TagEts1, avec une sonde Neo (Figures 16 et 17, C). Dans les cellules GP+E86-TagEts1 l'expression des transcrits rétroviraux est faible, surtout si elle est comparée à celle des transcrits exprimés dans les cellules GP+E86-DB. Les protéines DBI et TagEts1 ont également été détectées dans ces mêmes cellules (Figures 16 et 17, D). La protéine TagEts1 a notamment été immunoprécipitée avec deux anticorps différents, un anticorps anti-Ets1 et un anticorps anti-Tag (Figure 17, D).

Discussion :

Ces résultats préliminaires indiquent que deux nouveaux outils sont utilisables pour poursuivre le travail déjà entrepris. Toutefois, il faut rester prudent sur la qualité des rétrovirus MFG-TagEts1. La faible expression des transcrits viraux n'est pas très encourageante et les infections de fibroblastes ou de cellules endothéliales par ces vecteurs déjà entrepris n'a pas permis une expression suffisamment élevée de la protéine TagEts1 pour qu'elle puisse être détectée. Des expériences complémentaires doivent être envisagées avant une utilisation de ces vecteurs.

Ces nouvelles constructions présentent plusieurs intérêts. Analyser l'effet de Ets1-DBI, en comparaison avec les résultats déjà obtenus avec Ets1-DB tronqué en partie carboxy-terminale, permettrait de vérifier si ses compétences sont réellement plus réduites ou si son mode d'action est différent (par association avec des cofacteurs par exemple). La surexpression du facteur de transcription Ets1 dans les cellules endothéliales permettra de compléter les résultats acquis et surtout de préciser éventuellement une fonction pour le facteur de transcription Ets1 lui même.

Conclusion.

Finalement, avons nous répondu à la question que nous nous étions posée sur le rôle des facteurs de transcription de la famille Ets dans le processus angiogénique ? Le défi était quand même de taille ! Malheureusement, la réponse à cette question reste mitigée. Le rôle des membres de la famille Ets dans la régulation de l'adhérence cellulaire est incontestable mais il reste à déterminer par quels mécanismes l'adhérence cellulaire est contrôlée par ces facteurs et quels sont les gènes cibles mis en jeu dont l'expression est affectée.

En tant que pionniers dans le domaine, nous ne pouvons pas cacher une certaine déception de ne pas avoir « décortiqué » plus finement l'effet de ce dominant négatif de Ets1 dans les cellules endothéliales. Cette étude tend à réorienter les recherches sur le rôle des facteurs de transcription de la famille Ets dans l'angiogenèse. Elle vient aussi bousculer certaines théories qui nous l'avons vu sont particulièrement bien défendues par d'autres. Ces travaux sont inachevés et peuvent encore mettre en évidence des effets intéressants. De nombreux points sont encore à étudier et les propositions que nous avons citées sont loin d'être exhaustives.

Seule une toute petite étape vient donc d'être franchie mais pour me consoler j'ai conscience que l'histoire ne fait que commencer...

Références bibliographiques.

- Adamis, A. P., Miller, J. W., Bernal, M.-T., D'Amico, D. J., Folkman, J., Yeo, T.-K., and Yeo, K.-T.** (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* **118**, 445-450.
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. V., Aiello, L. M., Ferrara, N., and King, G. L.** (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **331**, 1480-1487.
- Alby, L., and Auerbach, R.** (1984). Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 5739-5743.
- Alexander, J. S., Blaschuk, O. W., and Haselton, F. R.** (1993). An N-cadherin-like protein contributes to solute barrier maintenance in cultured endothelium. *J. Cell. Physiol.* **156**, 610-615.
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, A., Stone, J., and Keshet, E.** (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has applications for retinopathy of prematurity. *Nature Med.* **1**, 1024-1028.
- Amaya, E., Musci, T. J., and Kirschner, M. W.** (1991). Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos. *Cell* **66**, 257-270.
- Anand-Apte, B., Pepper, M. S., Voest, E., Montesano, R., Olsen, B., Murphy, G., Apte, S. S., and Zetter, B.** (1997). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol.* **38**, 817-823.
- Anderson, J. M., Balda, M. S., and Fanning, A. S.** (1993). The structure and regulation of tight junctions. *Curr. opin. Cell Biol.* **5**, 772-778.
- Andrade, S. P., Cardoso, C. C., Machado, R. D., and Beraldo, W. T.** (1996). Angiotensin-II-induced angiogenesis in sponge implants in mice. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **16**, 302-307.
- Angiolillo, A. L., Sgadari, C., and Tosato, G.** (1996). A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **795**, 158-167.
- Antonelli-Orlidge, A., Saunders, K. B., Smith, S. R., and D'Amore, P. A.** (1989). An activated form of transforming growth factor β is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. **86**, 4544-4548.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., Bunn, H. F., and Livingston, D. M.** (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 12969-12973.
- Auerbach, R., Lu, W. C., Pardon, E., Gumkowski, F., Kaminska, G., and Kaminski, M.** (1987). Specificity of adhesion between murine tumor cells and capillary endothelium: an *in vitro* correlate of preferential metastasis *in vivo*. *Cancer Res.* **47**, 1492-1496.

- Ausprunk, D. H., and 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., and Folkman, J.** (1975). Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois. Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am. J. Pathol.* **79**, 597-618.
- Ayalon, O., Sabanai, H., Lampugnani, M.-G., Dejana, E., and Geiger, B.** (1994). Spatial and temporal relationships between cadherins and PECAM-1 in cell-cell junctions of human endothelial cells. *J. Cell Biol.* **126**, 247-258.
- Azuma, M., Tamatani, T., Fukui, K., Yuki, T., Yoshida, H., Bando, T., Hoque, M. O., Kamagashira, T., Ogino, K., Nishino, N., Suzuki, T., and Sato, M.** (1994). Identification of EGF as an angiogenic factor present in conditioned medium from human salivary gland adenocarcinoma cell clones with varying degrees of metastatic potential. *Cancer Lett.* **84**, 189-198.
- Bacharach, E., Itin, A., and Keshet, E.** (1992). In vivo patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-1 suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10686-10690.
- Bagavandoss, P., and Wilks, J. W.** (1990). Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**, 867-872.
- Bassuk, A. G., and Leiden, J. M.** (1995). A direct physical association between ETS and AP-1 transcription factors in normal human T cells. *Immunity* **3**, 223-237.
- Beauvais-Jouneau, A., and Thiery, J.-P.** (1997). Multiple roles for integrins during development. *Biol. Cell* **89**, 5-11.
- Beck, L., and D'Amore, P.** (1997). Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.* **11**, 365-373.
- Bellacosa, A., Datta, K., Bear, S. E., Patriotis, C., Lazo, P. A., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Tschlis, P. N.** (1994). Effects of provirus integration in the Tpl-1/Ets-1 locus in moloney murine leukemia virus-induced rat T-cell Lymphomas- levels of expression, polyadenylation, transcription initiation, and differential splicing of the Ets-1 mRNA. *J. Virol.* **68**, 2320-2330.
- Beyer, E. C.** (1993). Gap Junctions. *Int. Rev. Cytol.* **137C**, 1-37.
- Beyer, E. C., Paul, D. L., and Goodenough, D. A.** (1990). Connexin family of gap junction proteins. *Membrane Biol.* **116**, 187-194.
- Bhat, N. K., Komschlies, K. L., Fujiwara, S., Fisher, R., Mathieson, B. J., Gregorio, T. A., Young, H. A., Kasik, J. W., Ozato, K., and Papas, T. S.** (1989). Expression of ets genes in mouse thymocyte subsets and T cells. *J. Immunol.* **142**, 672-678.

Blair, R. J., Meng, H., Marchese, M. J., Ren, S., Schwartz, L. B., Tonnesen, M. G., and Gruber, B. L. (1997). Human mast cells stimulate vascular tube formation. Trypsase is a novel, potent angiogenic agent. *J. Clin. Invest.* **99**, 2691-2711.

Bollag, W., and Holdener, E. E. (1992). Retinoids in cancer prevention and therapy. *Ann. Oncol.* **3**, 513-526.

Bolon, I., Gouyer, V., Devouassoux, M., Vandebunder, B., Wernert, N., Moro, D., Brambilla, C., and Brambilla, E. (1995). Expression of c-ets-1, collagenase 1 and urokinase-type plasminogen activator genes in lung carcinomas. *Am. J. Pathol.* **147**, 1298-1310.

Bories, J. C., Willerford, D. M., Grévin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stéhelin, D., and Alt, F. W. (1995). Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature* **377**, 635-638.

Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S. C. (1996). How tumors become angiogenic. *Adv Cancer Res* **69**, 135-174.

Boulukos, K. E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A., and Ghysdael, J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5718-5721.

Breier, G., Albrecht, U., Sterrer, S., and Risau, W. (1992). Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* **114**, 521-532.

Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnürch, H., Gotsch, U., Vestweber, D., Risau, W., and Dejana, E. (1996). Molecular cloning and expression of murine Vascular Endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* **87**, 630-641.

Breier, G., Clauss, M., and Risau, W. (1995). Coordinate expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 (flt-1) and its ligand suggests a paracrine regulation of murine vascular development. *Dev. Dyn.* **204**, 228-239.

Brenner, C. A., Adler, R. R., Rappolee, D. A., Pedersen, R. A., and Werb, Z. (1989). Genes for extracellular matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev.* **3**, 848-859.

Brooks, P. C., Clark, R. A. F., and Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science* **264**, 569-571.

Brooks, P. C., Montgomery, A. M. P., Rosenfeld, M., Reisfeld, R. A., Hu, T., Klier, G., and Cheresh, D. A. (1994). Integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* **79**, 1157-1164.

Brooks, P. C., Strömblad, S., Sanders, L., von Schalscha, T. L., Aimes, R. T., Stetler-Stevenson, W. G., Quigley, J. P., and Cheresh, D. A. (1996). Localization of matrix

metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha v\beta 3$. *Cell* **85**, 683-693.

Brouty-Boye, D., and Zetter, B. R. (1980). Inhibition of cell motility by interferon. *Science* **208**, 516-518.

Brown, C. C., Hembry, R. M., and Reynolds, J. J. (1989). Immunolocalization of metalloproteinases and their inhibitor in the rabbit growth plate. *J. Bone Jt. Surg.* **71**, 580-593.

Brown, L. F., Detmar, M., Tognazzi, K., Abu-Jawdeh, G., and Iruela-Arispe, M. L. (1997). Uterine smooth muscle cells express functional receptors (flt-1 and KDR) for vascular permeability factor/Vascular endothelial growth factor. *Lab. Invest.* **76**, 245-255.

Burbach, K. M., Poland, A., and Bradfield, C. A. (1992). Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8185-8189.

Bussolino, F., Ziche, M., Wang, J. M., Alessi, D., Morbidelli, L., Cremona, O., Bosia, A., Marchisio, P. C., and Mantovani, A. (1991). In vitro and in vivo activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J. Clin. Invest.* **87**, 986-995.

Buttice, G., Duterque-Coquillaud, M., Basuyaux, J. P., Carrère, S., Kurkinen, M., and Stéhelin, D. (1996). Erg, an Ets-family member, differentially regulates human collagenase1 (MMP1) and stromelysin1 (MMP3) gene expression by physically interacting with the Fos/Jun complex. *Oncogene* **13**, 2297-2306.

Camerer, E., Kolsto, A.-B., and Prydz, H. (1996). Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Throm. Res.* **81**, 1-41.

Cao, Y., Linden, P., Shima, D., Browne, F., and Folkman, J. (1996). In vivo angiogenic activity and hypoxia induction of heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. *J. Clin. Invest.* **98**, 2507-2511.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435-439.

Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., Van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D., and Mulligan, R. C. (1993). Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice: generation by homologous recombination and characterization. *J. Clin. Invest.* **92**, 2746-2755.

Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., Müller, M., Risau, W., Edgington, T., and Collen, D. (1996). Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**, 73-75.

- Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., Van Den Oord, J. J., Collen, D., and Mulligan, R. C.** (1994). Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature* **368**, 419-424.
- Chen, J. H.** (1990). Cloning, sequencing, and expression of mouse *c-ets-1* cDNA in baculovirus expression system. *Oncogene Res.* **5**, 277-285.
- Chen, J. H., Vercamer, C., Li, Z., Paulin, D., Vandenbunder, B., and Stehelin, D.** (1996). PEA3 transactivates vimentin promoter in mammary epithelial and tumor cells. *Oncogene* **13**, 1667-1676.
- Chen, J. H., and Wright, C. D.** (1993). PEA3, Oct 1 and Oct 2 positively regulate the human ETS1 promoter. *Oncogene* **8**, 3375-3383.
- Chen, Z. Q., Fisher, R. J., Riggs, C. W., Rhim, J. S., and Lautenberger, J. A.** (1997). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by ETS1 antisense oligonucleotides. *Cancer Research* **57**, 2013-2019.
- Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Ziche, M., and Bicknell, R.** (1997). An angiogenic role for the neurokinins midkine and pleiotrophin in tumorigenesis. *Cancer Res.* **57**, 1814-1819.
- Citi, S., Sabanay, H., Jakes, R., Geiger, B., and Kendrick-Jones, J.** (1988). Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* **333**, 272-276.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F., and Weiner, R. I.** (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of the human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**, 1292-1299.
- Clark, R. A. F., Tonnesen, M. G., Gailit, J., and Cheresch, D. A.** (1996). Transient functional expression of $\alpha v \beta 3$ on vascular cells during wound repair. *Am. J. Pathol.* **148**, 1407-1421.
- Collins, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D., and Maniatis, T.** (1995). Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9**, 899-909.
- Collyn d'Hooghe, M., Galiègue-Zouitina, S., Szymiczek, D., Lantoine, D., Quief, S., Loucheux-Lefebvre, M.-H., and Kerckaert, J.-P.** (1993). Quantitative and qualitative variation of ETS-1 transcripts in hematologic malignancies. *Leukemia* **7**, 1777-1785.
- Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Siegel, N. R., Leimgruber, R. M., and Feder, J.** (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **84**, 1470-1478.
- Cormier, F., de Paz, P., and Dieterlen-lièvre, F.** (1986). *In vitro* detection of cells with monocytic potentiality in the wall of the chick embryo aorta. *Dev. Biol.* **118**, 167-175.
- Costa, M., Danesi, R., Agen, C., Di Paolo, A., Basolo, F., Del Bianchi, S., and Del Tacca, M.** (1994). MCF-10A cells infected with the int-2 oncogene induce angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane and in the rat mesentery. *Cancer Res.* **54**, 9-11.

Cozzolino, F., Torcia, M., Aldinucci, D., Ziche, M., Almerigogna, F., Bani, D., and Stern, D. M. (1990). Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6487-6491.

Crépieux, P., Coll, J., and Stéhelin, D. (1994). The Ets family of proteins : weak modulators of gene expression in quest for transcriptional partners. *Crit. Rev. Oncogen.* **5**, 615-638.

Davis, G. E., and Camarillo, C. W. (1996). An $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependant pinocytotic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp. Cell Res.* **224**, 39-51.

Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C., and Yankopoulos, G. D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* **87**, 1161-1169.

de Taisne, C., Gégonne, A., Stéhelin, D., Bernheim, A., and Berger, R. (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature* **310**, 581-583.

Dejana, E. (1996). Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **98**, 1949-1953.

Dejana, E., Corada, M., and Lampugnani, M. G. (1995). Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB* **9**, 910-918.

DeLisser, H. M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Robinson, C. S., Wexler, R. S., Kerr, J. S., Garlanda, C., Merwin, J. R., Madri, J. A., and Albelda, S. M. (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **151**, 671-677.

Delli-Bovi, P., Curatola, A. M., Kern, F. G., Greco, A., Ittmann, M., and Basilico, C. (1987). An oncogene isolated by transfection of Kaposi's sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the FGF family. *Cell* **50**, 729-737.

Denekamp, J., and Hobson, B. (1982). Endothelial cell proliferation in experimental tumours. *Br. J. Cancer* **46**, 711-720.

Deroanne, C. F., Colige, A. C., Nusgens, B. V., and Lapiere, C. M. (1996). Modulation of expression and assembly of vinculin during in vitro fibrillar collagen-induced angiogenesis and its reversal. *Exp. Cell Res.* **224**, 215-223.

Desbiens, X., Queva, C., Jaffredo, T., Stéhelin, D., and Vandenbunder, B. (1991). The relationship between cell proliferation and the transcription of the nuclear oncogenes c-myc, c-myb and c-ets-1 during feather morphogenesis in the chick embryo. *Development* **111**, 699-713.

Dhordain, P., Dewitte, F., Desbiens, X., Stéhelin, D., and Duterque-Coquillaud, M. (1995). Mesodermal expression of the chicken *erg* gene associated with precartilaginous condensation and cartilage differentiation. *Mec. Dev.* **50**, 17-28.

Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S., and Akhurst, R. J. (1995). Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- β 1 knock out mice. *Development* **121**, 1845-1854.

Dieterlen-Lièvre, F. (1975). On the origin of haemopoietic stem cells in the avian embryo: an experimental approach. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 607-619.

Dieterlen-Lièvre, F., Pardanaud, L., Yassine, F., and Cormier, F. (1988). Early haemopoietic stem cells in the avian embryo. *J. Cell Sci. Suppl* **10**, 29-44.

DiSalvo, J., Bayne, M. L., Conn, G., Kwok, P. W., Trivedi, P. G., Soderman, D. D., Palisi, T. M., Sullivan, K. A., and Thomas, K. A. (1995). Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor - placenta growth factor heterodimer. *J. Biol. Chem.* **270**, 7717-7723.

Dony, C., and Gruss, P. (1987). Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal web tissue. *Nature* **328**, 711-714.

Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G., Alitalo, K., and Breitman, M. L. (1995). Vascularization of the embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev. Dyn.* **203**, 80-92.

Duterque-Coquillaud, M., Leprince, D., Flourens, A., Henry, C., Ghysdael, J., Debuire, B., and Stehelin, D. (1988). Cloning and expression of chicken p54c-ets cDNAs: the first p54c-ets coding exon is located into the 40.0 kbp genomic domain unrelated to v-ets. *Oncogene Res.* **2**, 335-344.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., and Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **146**, 1029-1039.

Dvorak, H. F., and Gresser, I. (1989). Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumors in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 497-502.

Dvorak, H. F., Harvey, V. S., and McDonagh, J. (1984). Quantitation of fibrinogen influx and fibrin deposition and turnover in line 1 and line 10 guinea pig carcinomas. *Cancer Res.* **44**, 3348-3354.

Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, J. T., and Dvorak, A. M. (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am. J. Pathol.* **133**, 95-109.

Eichmann, A., Corbel, C., Nataf, V., Vaigot, P., Bréant, C., and LeDouarin, N. M. (1997). Ligand-dependent development of the endothelial and hematopoietic lineages from embryonic mesodermal cells expressing vascular endothelial growth factor receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 5141-5146.

Eisman, J. A., Barkla, D. H., and Tutton, P. J. (1987). Suppression of in vivo growth of human cancer solid tumor xenografts by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Cancer Res.* **47**, 21-25.

Ema, M., Morita, M., Ikawa, S., Tanaka, M., Matsuda, Y., Gotoh, O., Saijoh, Y., Fujii, H., Hamada, H., Kikuchi, Y., and Fujii-Kuriyama, Y. (1996). Two new members of the murine Sim gene family are transcriptional repressors and show different expression patterns during mouse embryogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5865-5875.

Enestein, J., Waleh, N. S., and Kramer, R. H. (1992). Basic FGF and TGF- β differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* **203**, 499-503.

Engerman, R., Pfaffenbach, D., and David, M. (1967). Cell turnover of capillaries. *Lab. Invest.* **17**, 738-743.

Fafeur, V., Tulasne, D., Queva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stehelin, D., Desbiens, X., and Vandebunder, B. (1997). The Ets1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter-factor stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth and Diff.* **8**, 655-665.

Fan, T. P. D., Jaggar, R., and Bicknell, R. (1995). Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting og gene therapy. *TiPS* **16**, 57-66.

Fässler, R., Georges-Labouesse, E., and Hirsch, E. (1996). Genetic analyses of integrin function in mice. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 641-646.

Fernandez, L. A., Twickler, J., and Mead, A. (1985). Neovascularization produced by angiotensin II. *J. Lab. Clin. Med* **105**, 141-145.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J., and Moore, M. W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439-442.

Ferrara, N., and Henzel, W. J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **161**, 851-858.

Ferrara, N., Houck, N., Jakeman, L., and Leung, D. W. (1992). Molecular and biological properties of the vacsular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* **13**, 18-32.

Fett, J. W., Strydom, D. J., Lobb, R. R., Alderman, E. M., Bethune, J. L., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1985). Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* **24**, 5480-5486.

Finkel, T., and Epstein, S. E. (1995). Gene therapy for vascular disease. *FASEB J.* **9**, 843-851.

Fisher, R. J., Fivash, M., Casa-Finet, J., Erickson, J. W., Kondoh, A., Bladen, S. V., Fisher, C., Watson, D. K., and Papas, T. (1994). Real-time DNA binding measurement of the ETS1

recombinant oncoproteins reveal significant kinetic differences between the p42 and p51 isoforms. *Protein Sci.* **3**, 257-266.

Flamme, I., Breier, G., and Risau, W. (1995). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev. Biol.* **169**, 699-712.

Fleischman, L. F., Holtzclaw, L., Russell, J. T., Mavrothalassitis, G., and Fisher, R. J. (1995). *ets-1* in astrocytes: expression and transmitter-evoked phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 925-931.

Flenniken, A. M., and Williams, B. R. G. (1990). Developmental expression of the endogenous TIMP gene and a TIMP-LacZ fusion gene in transgenic mice. *Genes Dev.* **4**, 1094-1106.

Folkman, J. (1984). Angiogenesis. *Biology of endothelial cells*. Ed. Jaffer E. A., 413-428.

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

Folkman, J., and D'Amore, P. A. (1996). Blood vessel formation: What is its molecular basis? *Cell* **87**, 1153-1155.

Folkman, J., and Haudenschild, C. (1980). Angiogenesis *in vitro*. *Nature* **288**, 551-556.

Folkman, J., and Shing, Y. (1992). Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 10931-10934.

Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M. L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66-70.

Fotsis, T., Zhang, Y., Pepper, M. S., Adlercreutz, H., Montessano, R., Nawroth, P. P., and Schweigerer, L. (1994). The endogenous oestrogen metabolite 2-methoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth. *Nature* **368**, 237-239.

Fox, P. L., Sa, G., Dobrowolski, S. F., and Stacey, D. W. (1994). The regulation of endothelial cell mobility by p21 *ras*. *Oncogene* **9**, 3519-3526.

Fox, S. B., Gatter, K. C., and Harris, A. L. (1996). Tumor angiogenesis. *J. Pathol.* **179**, 232-237.

Fräter-Schröder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Böhlen, 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**, 5277-5281.

Friederici, H. H. R. (1968). The tridimensional ultrastructure of fenestrated capillaries. *J. Ultrastruct. Res.* **23**, 444-456.

Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* **123**, 1777-1788.

Galang, C. K., Der, C. J., and Hauser, C. A. (1994). Oncogenic Ras can induce transcriptional activation through a variety of promoter elements, including tandem c-Ets-2 binding sites. *Oncogene* **9**, 2913-2921.

Gégonne, A., Bosselut, R., Bailly, R. A., and Ghysdael, J. (1993). Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.* **12**, 1169-1178.

Gengrinovitch, S., Greenberg, S. M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T. E., Levi, B. Z., and Neufeld, G. (1995). Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**, 15059-15065.

Ghysdael, J., and Boureux, A. (1997). The ETS family of transcriptional regulators. Progress in gene expression (M. Karin, Ed.) Birkhauser Verlag Basel/Switzerland, 29-89.

Ghysdael, J., Gégonne, A., Pognonec, P., Dernis, D., Leprince, D., and Stéhelin, D. (1986). Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a c-ets1 oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1714-1718.

Gille, J., Swerlick, R. A., and Caughman, S. W. (1997). Transforming growth factor- α -induced transcriptional activation of the vascular permeability factor (VPF/VEGF) gene requires AP-2-dependent DNA binding and transactivation. *EMBO J.* **16**, 750-759.

Gilles, F., Raes, M. B., Stéhelin, D., Vandebunder, B., and Fafeur, V. (1996). The *c-ets-1* proto-oncogene is a new early response gene differentially regulated by cytokines and growth factors in human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **222**, 370-378.

Gimbrone, M. A., Cotran, R. S., Leapman, S. B., and Folkman, J. (1974). Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 413-427.

Giovane, A., Pintzas, A., Maira, S. M., Sobieszczuz, P., and Wasyluk, B. (1994). Net, a new ets transcription factor that is activated by Ras. *Genes Dev.* **8**, 1502-1513.

Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., LeBeau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1990). A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6624-6628.

Gospodarowicz, D., Abraham, J. A., and Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7311-7315.

Gospodarowicz, D., Bialecki, H., and Thakral, T. K. (1979). The angiogenic activity of the fibroblast and epidermal growth factor. *Exp. Eye Res.* **28**, 501-514.

Gospodarowicz, D., Greenburg, G., Foidart, J. M., and Savion, N. (1981). The production and localisation of laminin in cultured vascular and corneal endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **107**, 171-183.

Gospodarowicz, D., Moran, J., Braun, D., and Birdwell, C. (1976). Clonal growth of bovine vascular endothelial cells: fibroblast growth factor as a survival agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4120-4124.

Gospodarowicz, D., Moran, J. S., and Braun, D. L. (1977). Control of proliferation of bovine endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **91**, 377-385.

Graf, T., Oker-Blom, N., Todorov, T. G., and Beug, H. (1979). Transforming capacities and defectiveness of avian leukemia virus OK10 and E26. *Virology* **93**, 431-436.

Grant, D. S., and Kleinman, H. K. (1997). Regulation of capillary formation by laminin and other components of the extracellular matrix. *EXS* **79**, 317-333.

Grant, D. S., Kleinman, H. K., Goldberg, I. D., Bhargava, M. M., Nickoloff, B. J., Kinsella, J. L., Polverini, P., and Rosen, E. M. (1993). Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1937-1941.

Grant, D. S., Lelkes, P. I., Fukuda, K., and Kleinman, H. K. (1991). Intracellular mechanisms involved in basement membrane induced blood vessel differentiation *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **27**, 327-335.

Grant, D. S., Tashiro, K.-I., Segui-Real, B., Yamada, Y., Martin, G. R., and Kleinman, H. K. (1989). Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* **58**, 933-943.

Grant, M. B., Mames, R. N., Fitzgerald, C., Ellis, E. A., Aboufrikha, M., and Guy, J. (1993). Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia* **36**, 282-291.

Gray, S. T., Wilkins, R. J., and Yun, K. (1992). Interstitial collagenase gene expression in oral squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **141**, 301-306.

Gray, S. T., Yun, K., Motoori, T., and Kuys, Y. M. (1993). Interstitial collagenase gene expression in colonic neoplasia. *Am. J. Pathol.* **143**, 663-671.

Greenblatt, M., and Shubik, P. (1968). Tumor angiogenesis; transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer. Inst.* **41**, 111-124.

Grevin, D., Chen, J. H., Raes, M. B., Stehelin, D., Vandenbunder, B., and Desbiens, X. (1993). Involvement of the proto-oncogene c-ets 1 and the urokinase plasminogen activator during mouse implantation and placentation;. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 519-529.

Gualandris, A., Rusnati, M., Belleri, M., Nelli, E. E., Bastaki, M., Molinari-Tosatti, M. P., Bonardi, F., Parolini, S., Albini, A., Morbidelli, L., Ziche, M., Corallini, A., Possati, L., Vacca, A., Ribatti, D., and Presta, M. (1996). Basic fibroblast growth factor overexpression in

endothelial cells: an autocrine mechanism for angiogenesis and angioproliferative diseases. *Cell Growth & Diff.* **7**, 147-160.

Guillemin, K., and Krasnow, M. A. (1997). The hypoxic response: huffing and HIFing. *Cell* **89**, 9-12.

Gumbiner, B., Lowenkopf, T., and Apatira, D. (1991). Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3460-3464.

Gumbiner, B. M. (1996). Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**, 345-357.

Gutman, A., and Waslyk, B. (1990). The collagenase gene promoter contains a TPA and oncogene-responsive unit encompassing the PEA3 and AP-1 binding sites. *The Embo J* **9**, 2241-2246.

Hagman, J., and Grosschedl, R. (1992). An inhibitory carboxyl-terminal domain in Ets-1 and Ets-2 mediates differential binding of ETS family factors to promoter sequences of the *mb-1* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 8889-8893.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353-364.

Hashimoto, M., Ohsawa, M., Ohnishi, A., Naka, N., Hirota, S., Kitamura, Y., and Aozasa, K. (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor mRNA in angiosarcoma. *Lab. Invest.* **73**, 859-863.

Hayek, A., Culler, F. L., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Cuevas, P., and Baird, A. (1987). An *in vivo* model for study of the angiogenic effects of basic fibroblast growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **147**, 876-880.

Hierck, B. P., Gittenberger-DE Groot, A. C., Van Iperen, L., Brouwer, A., and Poelmann, R. E. (1996). Expression of the $\beta 4$ integrin subunit in the mouse heart during embryonic development: retinoic acid advances $\beta 4$ expression. *Dev. Dyn.* **207**, 89-103.

Hierck, B. P., Poelmann, R. E., van Iperen, L., Brouwer, A., and Gittenberger-De Groot, A. C. (1996). Differential expression of $\alpha 6$ and other subunits of laminin binding integrins during development of the murine heart. *Dev. Dyn.* **206**, 100-111.

Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., and Rubin, L. L. (1997). Occludin as possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **110**, 1603-1613.

Hirschi, K. K., and D'Amore, P. A. (1997). Control of angiogenesis by the pericyte: molecular mechanisms and significance. *EXS* **79**, 419-428.

Ho, C. I., Bhat, N. K., Gottschalk, L. R., Lindsten, T., Thompson, C. B., Papas, T. S., and Leiden, J. M. (1990). Sequence-specific binding of human Ets-1 to the T cell receptor α gene enhancer. *Science* **250**, 814-818.

Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A., and Hankinson, O. (1991). Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* **252**, 954-958.

Hou, J., Baichwal, V., and Cao, Z. (1994). Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding ICAM-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1641-1645.

Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D. W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol.* **5**, 1806-1814.

Hu, D. E., Hori, Y., and Fan, T. P. (1993). Interleukin-8 stimulates angiogenesis in rats. *Inflammation* **17**, 135-143.

Hu, G. F., Riordan, J. F., and Vallee, B. L. (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2204-2209.

Huguet, C., Bouali, F., Enrietto, P. J., Stehelin, D., Vandebunder, B., and Abbadie, C. (1997). The avian transcription factor c-Rel is expressed in lymphocyte precursor cells and antigen-presenting cells during thymus development. *Dev. Immunol.* *in press*.

Hynes, R. O. (1992). Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**, 11-25.

Ingber, D., and Folkman, J. (1988). Inhibition of angiogenesis through modulation of collagen metabolism. *Lab. Invest.* **59**, 44-51.

Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., Sudo, K., Kanamaru, T., Brem, H., and Folkman, J. (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* **348**, 555-557.

Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., and Heldin, C.-H. (1989). Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* **338**, 557-562.

Isner, J. M., Pieczek, A., Schainfeld, R., Blair, R., Halay, L., Asahara, T., Rosenfield, K., Razvi, S., Walsh, K., and Symes, J. (1996). Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF₁₆₅ in patient with ischaemic limb. *Lancet* **348**, 370-374.

Ivanov, X., Mladenov, Z., Nedyalkov, S., and Todorov, T. G. (1962). Experimental investigations into avian leukosis. I. Transmission experiments of certain diseases of the avian leukosis complex, found in Bulgaria. *Bulgarian Acad. Sci. Bull. Inst. Pathol. Comp. Animaux Domestiques* **9**, 5-36.

Iwasaka, C., Tanaka, K., Abe, M., and Sato, Y. (1996). Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinase-type plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* **169**, 522-531.

Jackson, D., O.V., V., Bouck, N., and Linzer, D. I. (1994). Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein. *Science* **266**, 1581-1584.

Jaffe, E. A., and Mosher, D. F. (1978). Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *J. Exp. Med.* **147**, 1779-1791.

Jeltsch, M., Kaipainen, A., Joukov, V., Meng, X., Lakso, M., Rauvala, H., Swartz, M., Fukumura, D., Jain, R. K., and Alitalo, K. (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science* **276**, 1423-1425.

Jockusch, B. M., Bubeck, P., Giehl, K., Kroemker, M., Moschner, J., Rothkegel, M., Rüdiger, M., Schlüter, K., Stanke, G., and Winkler, J. (1995). The molecular architecture of focal adhesions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 379-416.

Johnson, M. D., Kim, H. R., Chesler, L., Tsao-Wu, G., Bouck, N., and Polverini, P. J. (1994). Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J. Cell. Physiol.* **160**, 194-202.

Jonsen, M. D., Petersen, J. M., Xu, Q.-P., and Graves, B. J. (1996). Characterization of the cooperative function of inhibitory sequences in Ets-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2065-2073.

Jorcyk, C. L., Watson, D. K., Mavrothalassitis, G. J., and Papas, T. S. (1991). The human ets1 gene : genomic structure, promoter characterization and alternative splicing. *Oncogene* **6**, 523-532.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 290-298.

Kalebic, T., Garbisa, S., Glaser, B., and Liotta, L. A. (1983). Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science* **221**, 281-283.

Kanayasu, T., Nakao-Hayashi, J., Asuwa, N., Morita, I., Ishii, T., Ito, H., and Murota, S. (1989). Leukotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid endothelial cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 572-578.

Kanda, S., Landgren, E., Ljungström, M., and Claesson-Welsh, L. (1996). Fibroblast growth factor receptor 1-induced differentiation of endothelial cell line established from tsA58 large T transgenic mice. *Cell growth and Diff.* **7**, 383-395.

Karim, F. D., Urness, L. D., Thummel, C. S., Klemsz, M. J., McKercher, S. R., Celada, A., VanBeveren, C., Maki, R. A., Gunther, C. V., Nye, J. A., and Graves, B. J. (1990). The ETS-

domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev.* **4**, 1451-1453.

Karnovsky, M. J. (1981). Endothelial-vascular smooth muscle cell interactions. *Am. J. Pathol.* **103**, 200-206.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. (1989). Vascular permeability factor ; an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246**, 1309-1312.

Kendall, R. L., Wang, G., and Thomas, K. A. (1996). Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **226**, 324-328.

Khokha, R. (1994). Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 299-304.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Philips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-846.

Kimelman, D., Abraham, J. A., Haaparanta, J. A., Palisi, T. M., and Kirschner, M. W. (1988). The presence of fibroblast growth factor in the frog egg: its role as a natural mesoderm inducer. *Science* **242**, 1053-1056.

Kimelman, D., and Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF- β and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* **51**, 869-877.

Koch, A. E., Halloran, M. M., Haskell, C. J., Shah, M. R., and Polverini, P. J. (1995). Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* **376**, 517-519.

Koch, A. E., Harlow, L. A., Haines, G. K., Amento, E. P., Unemori, E. N., Wong, W. L., Pope, R. M., and Ferrara, N. (1994). Vascular endothelial growth factor: a cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **152**, 4149-4156.

Koch, A. E., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Harlow, L. A., DiPietro, L. A., Elner, V. M., Elner, S. G., and Strieter, R. M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* **258**, 1798-1801.

Kodandapani, R., Pio, F., Ni, C. Z., Picciali, G., Klemsz, M., McKercher, S., Maki, R. A., and Ely, K. R. (1996). A new pattern for helix-turn-helix recognition revealed by the PU.1 ETS-domain-DNA complex. *Nature* **380**, 456-460.

Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., and Papas, T. S. (1990). Isoforms of the human *ets-1* protein : generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**, 675-681.

- Koyama, N., Watanabe, S., Tezuka, M., Morisaki, N., Saito, Y., and Yoshida, S.** (1994). Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor. *J. Cell. Physiol.* **158**, 1-6.
- Kusaka, M., Sudo, K., Fujita, T., Marui, S., Itoh, F., Ingber, D., and Folkman, J.** (1991). Potent anti-angiogenic action of AGM-1470: comparison to the fumagillin parent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 1070-1076.
- Kuzu, I., Bicknell, R., Harris, A. L., Jones, M., Gatter, K. C., and Mason, D. Y.** (1992). Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.* **45**, 143-148.
- Laaroubi, K., Delbe, J., Vacherot, F., Desgranges, P., Tardieu, M., Jaye, M., Barritault, D., and Courty, J.** (1994). Mitogenic and in vitro angiogenic activity of human recombinant heparin affn regulatory peptide. *Growth Factors* **10**, 89-98.
- Labow, M. A., Norton, C. R., J.M., R., Lombard-Gillooly, K. M., Shuster, D. J., Hubbard, J., Bertko, R., Knaack, P. A., Terry, R. W., and Harbison, M. L.** (1994). Characterization of E-selectin deficient mice: demonstration os overlapping function of the endothelial selectins. *Immunity* **1**, 709-720.
- Laget, M.-P., Defosse, P.-A., Albagli, O., Baert, J.-L., Dewitte, F., Stehelin, D., and de Launoit, Y.** (1996). Two functionally distinct domains responsible for transactivation by the Ets family member ERM. *Oncogene* **12**, 1325-1336.
- Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., and Dejana, E.** (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, β -catenin, and α -catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J. Cell Biol.* **129**, 203-217.
- Lampugnani, M. G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, L. P., and Dejana, E.** (1992). A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J. Cell Biol.* **118**, 1511-1522.
- Langer, S. J., Bortner, D. M., Roussel, M. F., Sherr, C. J., and Ostrowski, M. C.** (1992). Mitogenic signaling by Colony-Stimulating Factor 1 and *ras* is suppressed by the *ets-2* DNA-binding domain and restored by *myc* overexpression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5355-5362.
- Lauffenburger, D. A., and Horwitz, A. F.** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**, 359-369.
- Lautenberger, J. A., Burdett, L. A., Gunnell, M. A., Qi, S., Watson, D. K., O'Brien, S. J., and Papas, T. S.** (1992). Genomic dispersal of the *ets* gene family during metazoan evolution. *Oncogene* **7**, 1713-1719.

Le Noble, F. A., Hekking, J. K., Van Straaten, H. W., Slaaf, D. W., and Struyker Boudier, H. A. (1991). Angiotensin II stimulates angiogenesis in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. *Eur. J. Pharmacol.* **195**, 305-306.

LeDouarin, N. (1973). A biological cell labeling technique and its use in experimental embryology. *Dev. Biol.* **30**, 217-222.

Leprince, D., Duterque, C. M., Li, R. P., Henry, C., Flourens, A., Debuire, B., and Stéhelin, D. (1988). Alternative splicing within the chicken c-ets1 locus : implications for transduction within the E26 retrovirus of the c-ets proto-oncogene. *J. Virol.* **62**, 3233-3241.

Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stéhelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* **306**, 395-397.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W.-J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246**, 1306-1309.

Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C. (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**, 1875-1887.

Levick, J. R., and Smaje, L. H. (1987). An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvasc. Res.* **33**, 233-256.

Lewis, H., Kaszubska, W., DeLamarter, J. F., and Whelan, J. (1994). Cooperativity between two NF- κ B complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5701-5709.

Li, C., and Poznansky, M. J. (1990). Characterization of the ZO-1 protein in endothelial and other cell line. *J. Cell Sci.* **97**, 231-237.

Liaw, C. W., Cannon, C., Power, M. D., Kiboneta, P. K., and Rubin, L. L. (1990). Identification and cloning of two species of cadherins in bovine endothelial cells. *EMBO J.* **9**, 2701-2708.

Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242-245.

Lobb, R. R., Alderman, E. M., and Fett, J. W. (1985). Induction of angiogenesis by bovine brain derived class 1 heparin-binding growth factor. *Biochemistry* **24**, 4969-4973.

Ma, G. T., Roth, M. E., Groskopf, J. C., Tsai, F.-Y., Orkin, S. H., Grosveld, F., Engel, J. D., and Linzer, D. I. H. (1997). GATA-2 and GATA-3 regulate trophoblast-specific gene expression in vivo. *Development* **124**, 907-914.

Mackman, N. (1995). Regulation of the tissue factor gene. *FASEB J.* **9**, 883-889.

- Mahadevan, V., Hart, I. R., and Lewis, G. P.** (1989). Factors influencing blood supply in wound granuloma quantitated by a new *in vivo* technique. *Cancer Res.* **49**, 415-419.
- Maione, T. E., Gray, G. S., Petro, J., Hunt, A. J., Donner, A. L., Bauer, S. I., Carson, H. F., and Sharpe, R. J.** (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* **247**, 77-79.
- Maltepe, E., Schmidt, J. V., Baunoch, D., Bradfield, C. A., and Celeste-Simon, M.** (1997). Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* **386**, 403-407.
- Mandriota, S. J., Seghezzi, G., Vassali, J.-D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, P., Mignatti, P., and Pepper, M. S.** (1995). Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 9709-9716.
- Markowitz, D., Goff, S., and Bank, A.** (1988). A safe packaging line for gene transfer : separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* **62**, 1120-1124.
- Matrisian, L. M.** (1990). Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *T.I.G.* **6**, 121-125.
- Mattot, V., Raes, M., Henriot, P., Eeckhout, Y., Stéhelin, D., Vandenbunder, B., and Desbiens, X.** (1995). Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell Sci.* **108**, 529-535.
- Mavrathalassitis, G., Fisher, R. J., Smyth, F., Watson, D. K., and Papas, T. S.** (1994). Structural interferences of the ETS1 DNA-binding domain determined by mutational analysis. *Oncogene* **9**, 425-435.
- Metz, T., and Graf, T.** (1991). Fusion of the nuclear oncoproteins v-Myb and v-Ets is required for the leukemogenicity of E26 virus. *Cell* **66**, 95-105.
- Mignatti, P., and Rifkin, D. B.** (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein* **49**, 117-137.
- Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ullrich, A.** (1994). Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk1 mutant. *Nature* **367**, 576-579.
- Millauer, B., Wizigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Moller, N. P. H., Risau, W., and Ullrich, A.** (1993). High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* **72**, 835-846.
- Miller, J. W., Adamis, A. P., Shima, D. T., D'Amore, P. A., Moulton, R. S., O'Reilly, M. S., Folkman, J., Dvorak, H. F., Brown, L. F., Berse, B., Yeo, T.-K., and Yeo, K.-T.** (1994). Vascular endothelial growth factor/Vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am. J. Pathol.* **145**, 574-584.

- Moghaddam, A., and Bicknell, R.** (1992). Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* **31**, 12141-12146.
- Moghaddam, A., Zhang, H. T., Fan, T. P., Hu, D. E., Lees, V. C., Turley, H., Fox, S. B., Gatter, K. C., Harris, A. L., and Bicknell, R.** (1995). Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 998-1002.
- Moses, M. A., Sudhalter, J., and Langer, R.** (1990). Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* **248**, 1408-1410.
- Müller, A. M., Medvinsky, A., Strouboulis, J., Grosveld, F., and Dzierzak, E.** (1994). Developmental of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. *Immunity* **1**, 291-301.
- Murphy, A. N., Unsworth, E. J., and Stetler-Stevenson, W. G.** (1993). Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. *J. Cell. Physiol.* **157**, 351-358.
- Murphy-Ullrich, J. E., and Höök, M.** (1989). Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **109**, 1309-1319.
- Mustonen, T., and Alitalo, K.** (1995). Endothelial receptor tyrosine kinases involved in angiogenesis. *J. Cell Biol.* **129**, 895-898.
- Nabel, E. G., Plautz, G., and Nabel, G. J.** (1991). Gene transfert into vascular cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* **17**, 162-167.
- Nakamura, S., Nakata, K., Kashimoto, S., Yoshida, H., and Yamada, M.** (1986). Antitumor effect of recombinant human interleukin 1 alpha against murine syngeneic tumors. *Jpn. J. Cancer Res.* **77**, 767-773.
- Nakanishi, Y., Sugiura, F., Kishi, J., and Hayakawa, T.** (1986). Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. *Dev. Biol.* **113**, 201-206.
- Nakao-Hayashi, J., Ito, H., Kanayasu, T., Morita, I., and Murota, S.** (1992). Stimulatory effects of insulin and insulin-like growth factor I on migration and tube formation by vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **92**, 141-149.
- Neish, A. S., Read, M. A., Thanos, D., Pine, R., Maniatis, T., and Collins, T.** (1995). Endothelial interferon regulatory factor 1 cooperates with NF- κ B as a transcriptional activator of vascular cell adhesion molecule 1. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2558-2569.
- Nelsen, B., Tian, G., Erman, B., Gregoire, J., Maki, R., Graves, B., and Sen, R.** (1993). Regulation of lymphoid-specific immunoglobulin heavy chain gene enhancer by ETS-domain proteins. *Science* **261**, 82-86.
- Nerlov, C., De Cesare, D., Pergola, F., Caracciolo, A., Blasi, F., Johnsen, M., and Verde, P.** (1992). A regulatory element that mediates co-operation between a PEA3-AP-1 element and an

AP-1 site is required for phorbol ester induction of urokinase enhancer activity in HepG2 hepatoma cells. *EMBO J.* **11**, 4573-4582.

Nerlov, C., Rorth, P., Blasi, F., and Johnsen, M. (1991). Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* **6**, 1583-1592.

Neufeld, G., and Gospodarowicz, D. (1987). Protamine sulfate inhibits mitogenic activities of the extracellular matrix and fibroblast growth factor, but potentiates that of epidermal growth factor. *J. Cell. Physiol.* **132**, 287-294.

Nicolson, G. L. (1988). Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites. *Biochim. Biophys. Acta.* **948**, 175-224.

Nicolson, G. L. (1988). Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Review* **7**, 143-188.

Nicosia, R. F., Nicosia, S. V., and Smith, M. (1994). Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis *in vitro*. *Am. J. Pathol.* **145**, 1023-1029.

Nomura, S., Hogan, B. L. M., Wills, A. J., Heath, J. H., and Edwards, D. R. (1989). Developmental expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) RNA. *Development* **105**, 575-583.

Norioka, K., Mitaka, T., Mochizuki, Y., Hara, M., Kawagoe, M., and Nakamura, H. (1994). Interaction of interleukin-1 and interferon-gamma on fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.* **85**, 522-529.

Nunn, M. F., Seeburg, P. H., Moscovici, C., and Duesberg, P. H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* **306**, 391-395.

Oikawa, T., Hirotani, K., Nakamura, O., Shudo, K., Hiragun, A., and Iwagushi, T. (1989). A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Lett.* **48**, 157-162.

Oikawa, T., Hirotani, K., Ogasawara, H., Katayama, T., Nakamura, O., Iwaguchi, T., and Hiragun, A. (1990). Inhibition of angiogenesis by vitamin D3 analogues. *Eur. J. Pharmacol.* **178**, 247-250.

Oka, T., Rairkar, A., and Chen, J. H. (1991). Structural and functional analysis of the regulatory sequences of the *ets-1* gene. *Oncogene* **6**, 2077-2083.

Olah, I., Medgyes, J., and Glick, B. (1988). Origin of aortic cell clusters in the chicken embryo. *Anat. Rec.* **222**, 60-68.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 2576-2581.

O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285.

O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin : A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**, 315-328.

Orlidge, A., and D'Amore, P. A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **105**, 1455-1462.

Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M. M. (1996). TGF- β receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* **176**, 297-302.

Pandolfi, P. P., Roth, M. E., Karis, A., Leonard, M. W., Dzierzak, E., Grosveld, F. G., Engel, J. D., and Lindenbaum, M. H. (1995). Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis. *Nat. Genet.* **11**, 40-44.

Pardanaud, L., and Dieterlen-Lievre, F. (1993). Emergence of endothelial and hemopoietic cells in the avian embryo. *Ant. Embryol.* **187**, 107-114.

Pardanaud, L., Yassine, F., and Dieterlen-Lièvre, F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* **105**, 473-485.

Pepper, M. S. (1997). Manipulating angiogenesis, From basic science to the bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**, 605-619.

Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1991). Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 902-906.

Pepper, M. S., Sappino, A. P., Stöcklin, R., Montesano, R., Orci, L., and Vassalli, J. D. (1993). Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J. Cell. Biol.* **122**, 673-684.

Pepper, M. S., Vassali, J. D., Montesano, R., and Orci, L. (1987). Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells. *J. Cell Biol.* **105**, 2535-2541.

Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T., and Graves, B. J. (1995). Modulation of transcription factor Ets1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* **269**, 1866-1869.

Plate, K. H., Breier, G., Weich, H. A., and Risau, W. (1992). Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature* **359**, 845-848.

- Plouët, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D.** (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* **8**, 3801-3806.
- Pognonec, P., Boulukos, K. E., Gespierre, J. C., Stehelin, D., and Ghysdael, J.** (1988). Mitogenic stimulation of thymocytes results in the calcium dependent phosphorylation of c-ets-1 proteins. *EMBO J.* **7**, 977-983.
- Polacek, D., Lal, R., Volin, M. V., and Davies, P. F.** (1993). Gap junctional communication between vascular cells. *Am. J. Pathol.* **142**, 593-606.
- Polakowski, I. J., Lewis, M. K., Muthukkaruppan, V. R., Erdman, B., Kubai, L., and Auerbach, R.** (1993). A ribonuclease inhibitor expresses anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. *Am. J. Pathol.* **143**, 507-517.
- Polette, M., Clavel, C., Cockett, M., Girod de Bentzmann, S., Murphy, G., and Birembaut, P.** (1993). Detection and localization of mRNAs encoding matrix metalloproteinases and their tissue inhibitor in human breast pathology. *Invasion Metastasis* **13**, 31-37.
- Polverini, P. J.** (1996). Cellular adhesion molecules ; newly identified mediators of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **148**, 1023-1029.
- Porta, M., Dosso, A. A., Williams, F. M., Kanse, S., and Kohner, E. M.** (1992). A study of the effects of angiotensins 1, 2, 3 and bradykinin on the replication of bovine retinal capillary endothelial cells and pericytes. *Eur. J. Ophthalmol.* **2**, 21-26.
- Prosser, H. M., Wotton, D., Gegonne, A., Ghysdael, J., Wang, S., Speck, N. A., and Owen, M. J.** (1992). A phorbol ester response element within the human T-cell receptor β -chain enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9934-9938.
- Queva, C., Leprince, D., Stéhelin, D., and Vandebunder, B.** (1993). p54^{c-ets-1} and p68^{c-ets-1}, the two transcription factors encoded by the c-ets-1 locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* **8**, 2511-2520.
- Rabault, B., and Ghysdael, J.** (1994). Calcium-induced phosphorylation of Ets1 inhibits its specific DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 28143-28151.
- Rabault, B., Roussel, M., Tran Quang, C., and Ghysdael, J.** (1996). Phosphorylation of ETS1 regulates the complementation of a CSF-1 receptor impaired in mitogenesis. *Oncogene* **13**, 877-881.
- Rastinejad, F., Polverini, P. J., and Bouck, N. P.** (1989). Regulation of the activity of a new inhibitor of angiogenesis by a cancer suppressor gene. *Cell* **56**, 345-355.
- Reddy, E. S., and Rao, V. N.** (1990). Localization and modulation of the DNA-binding activity of the human c-ets-1 protooncogene. *Cancer Res.* **50**, 5013-5016.
- Remy, P., Senan, F., Meyer, D., Mager, A. M., and Hindelang, C.** (1996). Overexpression of the *Xenopus* Xl-fli gene during early embryogenesis leads to anomalies in head and heart development and erythroid differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 577-589.

- Resnick, N., and Gimbrone, M. A. J.** (1995). Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression. *FASEB J.* **9**, 874-882.
- Reynaud, X., and Dorey, C. K.** (1994). Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **35**, 3169-3177.
- Ribatti, D., Vacca, A., Iurlaro, M., Ria, R., Roncali, L., and Dammacco, F.** (1996). Human recombinant interferon alpha-2a inhibits angiogenesis of chick area vasculosa in shell-less culture. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* **16**, 165-169.
- Risau, W.** (1995). Differentiation of endothelium. *FASEB J.* **9**, 926-933.
- Risau, W.** (1997). Mechanism of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
- Risau, W., Drexler, H., Mironov, V., Smits, A., Siegbahn, A., Funari, K., and Heldin, C. H.** (1992). Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth factors* **7**, 261-266.
- Risau, W., and Flamme, I.** (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Dev. Biol.* **11**, 73-91.
- 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., and Fauci, A. S.** (1986). Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 4167-4171.
- Romano-Spica, V., Georgiou, P., Suzuki, H., Papas, T. S., and Bhat, N. K.** (1995). Role of ETS1 in IL-2 gene expression. *J. Immunol.* **154**, 2724-2732.
- Romano-Spica, V., Suzuki, H., Georgiou, A., Chen, S. L., Ascione, R., Papas, T. S., and Bhat, N. K.** (1994). Expression of ets family genes in hematopoietic cells. *Int. J. Oncol.* **4**, 521-531.
- Rosen, E. M., Carley, W., and Goldberg, I. D.** (1990). Scatter factor regulates vascular endothelial cell motility. *Science* **8**, 647-650.
- Rubin, J. S., Chan, A. M., Bottaro, D. P., Burgess, W. H., Taylor, W. G., Cech, A. C., Hirschfield, D. W., Wong, J., Miki, T., and Finch, P. W.** (1991). A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 415-419.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., Morales, J., Tanner, L. I., Tomaselli, K. J., and Bard, F.** (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* **115**, 1725-1735.
- Sage, H., Pritzi, P., and Bornstein, P.** (1981). Secretory phenotypes of endothelial cells in culture: comparison of aortic, venous, capillary, and corneal endothelium. *Arteriosclerosis* **1**, 427-442.

- Salomon, D., Ayalon, O., Patel-King, R., Hynes, R. O., and Geiger, B.** (1992). Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells. *J. Cell Sci.* **102**, 7-17.
- Sappino, A. P., Huarte, J., Vassalli, J. D., and Belin, D.** (1991). Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney. *J.Clin.Invest.* **87**, 962-970.
- Sato, T. N., Tozawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., and Qin, Y.** (1995). Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* **376**, 70-74.
- Sato, Y., and Rifkin, D. B.** (1989). Inhibition of endothelial movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J. Cell Biol.* **109**, 309-315.
- Satoh, H., Zhong, Y., Isomura, H., Saitoh, M., Enomoto, K., Sawada, N., and Mori, M.** (1996). Localisation of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules, and cancer cells. *Exp. Cell Res.* **222**, 269-274.
- Schindler, U., and Baichwal, V. R.** (1994). Three NF-kB binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 5820-5831.
- Schreiber, A. B., Winkler, M. E., and Derynck, R.** (1986). Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232**, 1250-1252.
- Schwartz, M. A., Schaller, M. D., and Ginsberg, M. H.** (1995). Integrins: Emerging paradigms of signal transduction. *Annu. Rev. Dev. Biol.* **11**, 549-599.
- Senger, D. R., Galli, S. J., A.M., D., Perruzz, C. A., Harvey, V. S., and Dvorak, H. F.** (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* **219**, 983-985.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X.-F., Breitman, M. L., and Schuh, A. C.** (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* **376**, 62-66.
- Shapiro, R., and Vallee, B. L.** (1987). Human placental ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 2238-2241.
- Sharpe, R. J., Byers, H. R., Scott, C. F., Bauer, S. I., and Maione, T. E.** (1990). Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 848-853.
- Sheibani, N., and Frazier, W. A.** (1995). Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6788-6792.

- Shima, D. T., Adamis, A. P., Ferrara, N., Yeo, K.-T., Yeo, T.-K., Allende, R., Folkman, J., and D'Amore, P. A.** (1995). Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol. Med.* *1*, 182-193.
- Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., and Klagsbrun, M.** (1984). Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science* *223*, 1296-1299.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* *359*, 843-845.
- Sidky, Y. A., and Borden, E. C.** (1987). Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.* *47*, 5155-5161.
- Sieweke, M. H., Tekotte, H., Frampton, J., and Graf, T.** (1996). MafB is an interaction partner and repressor of Ets-1 that inhibits erythroid differentiation. *Cell* *85*, 49-60.
- Simionescu, M., and Simionescu, N.** (1991). Endothelial transport of macromolecules: transcytosis and endocytosis. *Cell Biol. Rev.* *25*, 5-80.
- Slack, J. M. W., and Isaacs, H. V.** (1989). Presence of basic fibroblast growth factor in the early *Xenopus* embryo. *Development* *105*, 147-153.
- Smith, D. R., Polverini, P. J., Kunkel, S. L., Orringer, M. B., Whyte, R. I., Burdick, M. D., Wilke, C. A., and Strieter, R. M.** (1994). Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J. Exp. Med.* *179*, 1409-1415.
- Smith, J. C., Price, B. M., Van Nimmen, K., and Huylebroeck, D.** (1990). Identification of a potent *Xenopus* mesoderm-inducing factor as a homologue of activin A. *Nature* *345*, 729-731.
- Somasundaram, K., Jayaraman, G., Williams, T., Moran, E., Frisch, S., and Thimmapaya, B.** (1996). Repression of a matrix metalloprotease gene by E1A correlates with its ability to bind to cell type-specific transcription factor AP-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *93*, 3088-3093.
- Soriano, P.** (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* *8*, 1888-1896.
- Stacey, K. J., Fowles, L. F., Colman, M. S., Ostrowski, M. C., and Hume, D. A.** (1995). Regulation of urokinase-type plasminogen activator gene transcription by Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 3430-3441.
- Strieter, R. M., Kunkel, S. L., Arenberg, D. A., Burdick, M. D., and Polverini, P. J.** (1995). Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *210*, 51-57.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., and Yancopoulos, G. D. (1996). Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* **87**, 1171-1180.

Takahashi, M., Kawabe, T., Ogura, K., Maeda, S., Mikami, Y., Kanebo, N., Terano, A., and Omata, M. (1997). Expression of vascular endothelial growth factor at the human ulcer margin and in cultured gastric fibroblasts: a new angiogenic factor for gastric ulcer healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 493-498.

Takigawa, M., Nishida, Y., Suzuki, F., Kishi, J., Yamashita, K., and Hayakawa, T. (1990). Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1264-1271.

Tannock, I. F. (1970). Population kinetics of carcinoma cells, capillary endothelial cells, and fibroblasts in a transplanted mouse mammary tumor. *Cancer Res.* **30**, 2470-2476.

Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A., and Giavazzi, R. (1990). Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J. Cell Biol.* **111**, 765-772.

Taylor, S., and Folkman, J. (1982). Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature* **297**, 307-312.

Terranova, V. P., DiFlorio, R., Lyall, R. M., Hic, S., Friesel, R., and Maciag, T. (1985). Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J. Cell Biol.* **101**, 2330-2334.

Thomas, K. A., Rios-Candelore, M., Gimenez-Gallego, G., DiSalvo, J., Benett, C., Rodkey, J., and Fitzpatrick, S. (1985). Pure brain-derived acidic fibroblast growth factor is a potent angiogenic vascular endothelial cell mitogen with sequence homology to interleukin 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 6409-6413.

Thompson, J. A., Anderson, K. D., DiPietro, J. M., Zwiebel, J. A., Zametta, M., Anderson, W. F., and Maciag, T. (1988). Site-directed neovessel formation in vivo. *Science* **241**, 1349-1352.

Thomsen, G., Woolf, T., Whitman, M., Sokol, S., Vaughan, J., Vale, W., and Melton, D. A. (1990). Activins are expressed early in *Xenopus* embryogenesis and can induce axial mesoderm and anterior structures. *Cell* **63**, 485-493.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C., and Abraham, J. A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* **266**, 11947-11954.

Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., and Bouck, N. (1993). Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J. Cell Biol.* **122**, 497-511.

Tsai, F. Y., Keller, G., Kuo, F. C., Weiss, M., Chen, J., Rosenblatt, M., Alt, F. W., and Orkin, S. H. (1994). An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* **371**, 221-226.

Tsuboi, R., Sato, Y., and Rifkin, D. B. (1990). Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J. Cell Biol.* **110**, 511-517.

Tsukita, S., Tsukita, S., Nagafuchi, A., and Yonemura, S. (1992). Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**, 834-839.

Tsuruoka, N., Sugiyama, M., Tawaragi, Y., Tsujimoto, M., Nishihara, T., Goto, T., and Sato, N. (1988). Inhibition of in vitro angiogenesis by lymphotoxin and interferon-gamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **155**, 429-435.

Underwood, J. C., and Carr, I. (1972). The ultrastructure and permeability characteristics of the blood vessels of a transplantable rat sarcoma. *J. Pathol.* **107**, 157-166.

Valiron, O., Chevrier, V., Usson, Y., Breviario, F., Job, D., and Dejana, E. (1996). Desmoplakin expression and organization at human umbilical vein endothelial cell-to-cell junctions. *J. Cell Sci.* **109**, 2141-2149.

Van den Eijnden-Van Raaj, A. J. M., Van Zoelent, E. J. J., Van Nimmen, K., Koster, C. H., Snoek, G. T., Durston, A. J., and Huylebroeck, D. (1990). Activin-like factor from a *Xenopus laevis* cell line responsible for mesoderm induction. *Nature* **345**, 732-734.

Vandenbunder, B., Pardanaud, L., Jaffredo, T., Mirabel, M. A., and Stehelin, D. (1989). Complementary patterns of expression of c-ets1, c-myb and c-myc in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* **107**, 265-274.

Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., and Huber, P. (1997). Targetted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 6273-6278.

Voest, E. E., Kenyon, B. M., O'Reilly, M. S., Truitt, G., D'Amato, R. J., and Folkman, J. (1995). Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 581-586.

Wang, G. L., Jiang, B.-H., Rue, E. A., and Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5510-5514.

Wang, L. C., Kuo, F., Fujiwara, Y., Gilliland, D. G., Golub, T. R., and Orkin, S. H. (1997). Yolk sac angiogenic defect and intra-embryonic apoptosis in mice lacking the Ets-related factor TEL. *EMBO J.* **16**, 4374-4383.

Wasylyk, C., Gutman, A., Nicholson, R., and Wasylyk, B. (1991). c-ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *The EMBO J* **10**, 1127-1134.

- Wasylyk, C., Kerckaert, J. P., and Wasylyk, B.** (1992). A novel modulator domain of Ets transcription factors. *Genes and Dev.* **6**, 965-974.
- Wasylyk, C., Maira, S. M., Sobieszczuk, P., and Wasylyk, B.** (1994). Reversion of Ras transformed cells by Ets transdominant mutants. *Oncogene* **9**, 3665-3673.
- Wasylyk, C., and Wasylyk, B.** (1992). Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of ets. *Cell Growth and Diff.* **3**, 617-625.
- Watson, D. K., McWilliams, M. J., and Papas, T. S.** (1988). Molecular organization of the chicken ets locus. *Virology* **164**, 99-105.
- Weeks, D. L., and Melton, D. A.** (1987). A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus* eggs codes for growth factor related to TGF- β . *Cell* **51**, 861-867.
- Wei, Y., Lukashev, M., Simon, D. I., Bodary, S. C., Rosenberg, S., Doyle, M. V., and Chapman, H. A.** (1996). Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* **273**, 1551-1555.
- Weinstat-Saslow, D. L., Zabrenetzky, V. S., VanHoutte, K., Frazier, W. A., Roberts, D. D., and Steeg, P. S.** (1994). Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res.* **54**, 6504-6511.
- Werner, M. H., Clore, G. M., Fischer, C. L., Fischer, R. J., Trinh, L., Shiloach, J., and Gronenborn, A. M.** (1995). The solution structure of the human ETS1-DNA complex reveals a novel mode of binding and true side chain intercalation. *Cell* **83**, 761-771.
- Wernert, N., Gilles, F., Fafeur, V., Bouali, F., Raes, M. B., Pyke, C., Dupressoir, T., Seitz, G., Vandebunder, B., and Stéhelin, D.** (1994). Stromal expression of c-ets1 transcription factor correlates with tumor invasion. *Cancer Res.* **54**, 5683-5688.
- Wernert, N., Raes, M. B., Lassalle, P., Dehouck, M. P., Gosselin, B., Vandebunder, B., and Stéhelin, D.** (1992). The c-ets 1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am. J. Pathology* **140**, 119-127.
- Whitley, M. Z., Thanos, D., Read, M. A., Maniatis, T., and Collins, T.** (1994). A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6464-6475.
- Wilkinson, D., Bhatt, S., Ryseck, R., and Bravo, R.** (1989). Tissue-specific expression of c-jun and junB during organogenesis in the mouse. *Development* **106**, 465-471.
- Woodland, H. R.** (1989). Mesoderm formation in *Xenopus*. *Cell* **59**, 767-770.
- Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L., and Rossant, J.** (1993). Flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* **118**, 489-498.

Yamamoto, T., Sudo, K., and Fujita, T. (1994). Significant inhibition of endothelial cell growth in tumor vasculature by an angiogenesis inhibitor, TNP-470 (AGM-1470). *Anticancer Res.* **14**, 1-3.

Yanase, T., Tamura, M., Fujita, K., Kodama, S., and Tanaka, K. (1993). Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.* **53**, 2566-2570.

Yang, B. S., Hauser, C. A., Henkel, G., Colman, M. S., Van Beveren, C., Stacey, K. J., Hume, D. A., Maki, R. A., and Ostrowski, M. C. (1996). Ras-mediated phosphorylation of a conserved threonine residue enhances the transactivation activities of c-Ets1 and c-Ets2. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 538-547.

Yang, E. Y., and Moses, H. L. (1990). Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *J. Cell Biol.* **111**, 731-741.

Yang, J. T., Rayburn, H., and Hynes, R. O. (1993). Embryonic mesodermal defects in $\alpha 5$ integrin-deficient mice. *Development* **119**, 1093-1105.

Yoshida, T., Ishimaru, K., Sakamoto, H., Yokota, J., Hirohashi, S., Igarashi, K., Sudo, K., and Terada, M. (1994). Angiogenic activity of recombinant hst-1 protein. *Cancer Lett.* **83**, 261-268.

Yoshiji, H., Gomez, D. E., Shibuya, M., and Thorgeirsson, U. P. (1996). Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* **56**, 2013-2016.

Zagris, N. (1980). Erythroid cell differentiation in unincubated chick blastoderm in culture. *J. Embryol. exp. Morph.* **58**, 209-216.

Zahraoui, A., Joberty, G., Arpin, M., Fontaine, J. J., Hedio, R., Tavitian, A., and Louvard, D. (1994). A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **124**, 101-115.

Zhong, Y., Saitoh, T., Minase, T., Sawada, N., Enomoto, K., and Mori, M. (1993). Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J. Cell Biol.* **120**, 477-483.

Ziche, M., Maglione, D., Ribatti, D., Morbidelli, L., Lago, C. T., Battisti, M., Paoletti, I., Barra, A., Tucci, M., Parise, G., Vincenti, V., Granger, H. J., Viglietto, G., and Persico, M. G. (1997). Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic and angiogenic. *Lab. Invest.* **76**, 517-531.

