



HAL
open science

L'angiogénine : implication dans l'angiogenèse et le développement tumoral

Nadine Pavlov, Josette Badet

► **To cite this version:**

Nadine Pavlov, Josette Badet. L'angiogénine : implication dans l'angiogenèse et le développement tumoral. Bulletin du Cancer, 2001, 88 (8), pp.725-732. hal-01634443

HAL Id: hal-01634443

<https://hal.science/hal-01634443>

Submitted on 14 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

L'angiogénine : implication dans l'angiogenèse et le développement tumoral

**Nadine
Pavlov
Josette
Badet**

Inserm U. 427, Université René-Descartes-Paris V, Faculté des Sciences pharmaceutiques et biologiques de Paris, 4, avenue de l'Observatoire, 75270 Paris Cedex 06. E-mail : badet@pharmacie.univ-paris5.fr

RESUME / SUMMARY

L'angiogénine est l'un des inducteurs les plus puissants de la néovascularisation dans les modèles expérimentaux d'angiogenèse. Elle est surexprimée chez les patients atteints de divers cancers. La principale caractéristique de cette protéine plasmatique est sa similitude structurale avec la ribonucléase pancréatique. L'angiogénine présente une activité ribonucléolytique et l'intégrité de son site catalytique est nécessaire, mais non suffisante, à l'expression de sa propriété angiogénique qui nécessite également un domaine d'interaction cellulaire. Malgré une connaissance approfondie de sa structure, son rôle physiologique reste méconnu. Cet article a pour objet d'approcher le rôle de ce facteur angiogénique en rapportant certaines de ses propriétés biologiques, biochimiques et structurales.

Mots clés | angiogénine, angiogenèse, cancer, inhibiteur de la ribonucléase, ribonucléase.

Angiogenin: involvement in angiogenesis and tumour growth

Angiogenin is one of the most potent inducers of neovascularization in experimental models in vivo. Angiogenin is normally present in plasma but overexpressed in cancer patients. The possible involvement of angiogenin in the development of cancer is suggested by its overexpression in patients with a variety of tumours and the observation that angiogenin antagonists prevent the growth of human tumour xenografts in athymic mice. This 14.1-kDa protein has 35% amino acid sequence identity with human pancreatic ribonuclease and displays ribonucleolytic activity. As only angiogenin is able to induce angiogenesis, its biological activities are thought to result from structural characteristics. Although the structural characteristics of angiogenin have been extensively studied, the understanding of its physiological role and of how its properties are expressed is still to be deciphered. This article reviews some of the biological, biochemical and structural properties of angiogenin.

Key-words | *angiogenin, angiogenesis, cancer, placental ribonuclease inhibitor, ribonuclease.*

ARTICLE

L'établissement d'un réseau vasculaire est essentiel au développement tissulaire et à son maintien. Il fait appel à deux mécanismes fondamentaux, la vasculogenèse et l'angiogenèse [1]. La vasculogenèse définit la formation *de novo* d'un réseau vasculaire primitif par différenciation et organisation *in situ* de cellules précurseurs en cellules endothéliales. L'angiogenèse concerne la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire préexistant. Chez l'adulte, le renouvellement des cellules endothéliales vasculaires se mesure en années. Cependant, lors de la croissance de nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales sont capables de proliférer rapidement avec un *turnover* de quelques jours. Cette néovascularisation est un événement rare dans des conditions physiologiques normales, limité au processus de cicatrisation ou de reproduction. Elle est étroitement contrôlée et strictement délimitée. Une angiogenèse non contrôlée est associée à des pathologies comme l'arthrite rhumatoïde et les rétinopathies vasoprolifératives. L'angiogenèse est également un événement clé du développement

tumoral, elle permet aux tumeurs malignes de se développer et de se propager [2]. Elle constitue une cible de choix dans la lutte contre la croissance des tumeurs solides [3]. Les événements morphologiques à la base du développement du système vasculaire sont bien décrits et des progrès sont faits dans la compréhension des mécanismes moléculaires mis en œuvre [4]. Un contexte spatio-temporel parfaitement défini (réceptivité cellulaire, cofacteurs, environnement physico-chimique...) est nécessaire pour coordonner le jeu des principaux acteurs de l'angiogenèse, facteurs physiques, interactions cellulaires, matrice extracellulaire, et les facteurs diffusibles qui jouent un rôle prépondérant.

Parmi ces facteurs, l'angiogénine, à des taux de quelques pico- ou femto-moles, induit la néovascularisation dans les modèles expérimentaux d'angiogenèse *in vivo*. Cette potentialité la place au niveau des facteurs angiogéniques les plus puissants. L'angiogénine est surexprimée dans les tissus cancéreux mais, comme les autres facteurs angiogéniques, elle n'est pas spécifique des tumeurs : cela souligne l'importance de l'étude de la régulation de son expression et de ses mécanismes d'action. Découverte en 1985, l'angiogénine a été isolée en premier lieu de surnageants de culture de cellules d'adénocarcinome de côlon humain HT29 grâce à sa propriété angiogénique [5]. Cette protéine sécrétée de 14,1 kDa est présente dans la circulation (100 à 400 ng/ml). Son appartenance à la famille des ribonucléases (RNase) [6] repose sur sa similitude de séquence avec la RNase pancréatique et son activité ribonucléolytique. Sachant que la RNase pancréatique n'est pas angiogénique, l'étude structurale comparative de ces deux molécules a permis une progression très rapide de la connaissance du rapport structure/fonction de l'angiogénine ([7] pour revue).

L'inhibiteur de la ribonucléase (PRI ou RNasine), isolé en premier lieu du placenta, est un inhibiteur compétitif très puissant de l'angiogénine ([8] pour revue). Sa localisation est intracellulaire. Expérimentalement, il inhibe toutes les propriétés connues de l'angiogénine. Son K_i est de l'ordre du femtomolaire. Il inhibe l'angiogenèse induite par l'angiogénine ainsi que celle induite par le *basic fibroblast growth factor* (FGF2) ou par l'orthovanadate de sodium (inhibiteur de phosphatase) chez la souris. Enfin, il bloque le développement tumoral et la formation de métastases [9]. Cet inhibiteur pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse et le développement tumoral.

La connaissance approfondie de la structure de l'angiogénine et de son inhibiteur grâce aux travaux principalement de l'équipe de Bert L. Vallee (Boston, États-Unis) permet d'aborder favorablement les domaines inexplorés du rôle physiologique et du mécanisme d'action de ces molécules. L'objet de cette revue est de présenter les multiples facettes de ce polypeptide découvertes au cours de ces quinze années d'études en intégrant les données récentes des études cliniques.

Propriétés biochimiques

L'angiogénine humaine, de masse moléculaire 14 124, est constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 123 acides aminés ([figure 1](#)). Elle présente trois ponts disulfures nécessaires pour ses activités et un point isoélectrique extrêmement basique ($> 9,5$). Sa structure cristallographique a été résolue à 2,4 Å ([figure 2](#)). À l'exception de la cyclisation de l'acide aminé amino-terminal ($< \text{Glu}$), elle ne présente pas de modification post-traductionnelle. Son gène et son acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) ont été caractérisés. Le gène *angiogénine* est localisé sur le chromosome humain 14, dans la région 14q11.

L'angiogénine (RNase 5) présente 35 % d'identité de séquence avec la RNase pancréatique humaine (RNase 1) et une similitude, déduite des substitutions homologues, de 68 %. Sa structure générale est similaire à celle de la RNase pancréatique. Cependant, une différence notable est la présence d'un domaine de liaison au récepteur à la place du domaine occupé par un quatrième pont disulfure dans la RNase pancréatique. Les trois acides aminés essentiels du site catalytique de la ribonucléase sont conservés dans l'angiogénine (histidine 13, lysine 40, histidine 114). De fait, l'angiogénine possède une activité enzymatique qui diffère cependant qualitativement et quantitativement de celle de la RNase pancréatique bovine (RNase A). Elle est 10^5 à 10^6 fois moins active que la RNase A sur les substrats nucléotidiques classiques de synthèse, l'ordre de préférence étant $\text{CpA} > \text{CpG} > \text{UpA} > \text{UpG}$. Elle

présente une activité spécifique ribonucléolytique vis-à-vis des acides ribonucléiques (ARN) ribosomiaux et des ARN de transfert. Elle clive l'ARN en 3' de la base pyrimidique par un mécanisme de transphosphorylation-hydrolyse et préfère, comme la RNase A, l'ARN simple brin. Elle inhibe la synthèse protéique *in vitro*, au niveau de l'élongation ou de la terminaison, et *in vivo* dans le modèle d'oocytes du xénope. La signification biologique de son activité ribonucléolytique dans un contexte de néovascularisation n'est pas comprise. Cependant, l'intégrité du site catalytique est nécessaire pour l'expression de son activité angiogénique ([7] pour revue).

Le PRI est une protéine acide (pI 4,7) composée de 460 acides aminés de masse moléculaire apparente 51 kDa. Il inhibe l'activité des membres de la super-famille de la RNase A ([8] pour revue). Il paraît ubiquitaire car son ARN messager (ARNm) d'environ 2 kb est présent dans les 16 tissus humains testés [10]. C'est un inhibiteur compétitif de l'angiogénine de stœchiométrie 1/1. L'angiogénine et le PRI interagissent *in vitro* avec des affinités remarquables ($K_i 7 \times 10^{-16}$ M). La demi-vie du complexe qu'ils forment est d'environ 60 jours *in vitro*. Cette forte interaction est essentiellement de nature électrostatique, avec une complémentarité chimique élevée, principalement dans le segment carboxy-terminal du PRI ([11] et références citées). À notre connaissance, ces deux molécules sont présentes dans des compartiments cellulaires différents. L'angiogénine est sécrétée. L'inhibiteur présentant 32 cystéines sous forme réduite est inactivé par oxydation. Il n'est actif que dans un environnement réducteur comme celui du compartiment intracellulaire. Cependant, par ses propriétés, il apparaît comme un inhibiteur naturel potentiel de l'angiogénine.

Expression

L'expression de l'angiogénine a été recherchée dans les liquides physiologiques et au niveau tissulaire chez l'homme et chez d'autres mammifères. Elle est présente dans le plasma humain normal ([tableau](#)), le liquide amniotique (7,8-43,3 ng/ml au second trimestre) [12] et le liquide folliculaire [13]. Dans le placenta à terme, elle est exprimée par les cellules trophoblastiques et celles de l'amnios, les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses, et par certaines cellules du mésenchyme [14]. Chez le bovin, sa concentration est estimée entre 100 et 180 ng/ml dans le sérum et entre 4 et 8 mg/l dans le lait. Au niveau des tissus bovins, elle a été localisée dans le foie, la vésicule biliaire, les glandes mammaires, l'ovaire, les cellules épithéliales et sécrétoires et les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses [15].

En culture cellulaire, l'angiogénine est sécrétée par toutes les cellules humaines à croissance dépendante d'ancrage testées, cellules normales vasculaires endothéliales et musculaires lisses, cellules épithéliales, normales et tumorales, et fibroblastes. Elle atteint des concentrations de l'ordre du ng/million de cellules [16, 17].

L'ARNm de l'angiogénine, d'environ 1 kb, est détecté dans de nombreux tissus humains : pancréas, poumon, prostate, testicule, ovaire, intestin grêle, côlon, cœur, rein, muscle squelettique et leucocytes. Le foie est l'organe où l'ARNm est le plus abondant [10].

Cette large expression suggère que la fonction physiologique de l'angiogénine n'est pas limitée à la néovascularisation.

Régulation

L'expression de l'angiogénine paraît régulée au cours du développement. Sa concentration dans le sérum humain augmente dans la période périnatale et atteint la concentration maternelle au jour 4 [18]. Ses transcrits sont régulés au cours du développement dans le foie du rat : le niveau des ARNm est bas chez le fœtus, augmente chez le nouveau-né et est maximal chez l'adulte [19].

L'angiogenèse est essentielle à la folliculogenèse, à l'ovulation et à la formation du corps jaune. L'expression de l'angiogénine dans l'ovaire a été étudiée chez l'homme et le bovin. Chez l'homme, des

éléments semblent indiquer que sa régulation peut être hormono-dépendante. Ainsi, sa production par les cellules de la granulosa humaine est stimulée par la choriogonadotropine (hCG) [13]. Cette étude est à rapprocher de l'observation de concentrations très élevées d'angiogénine dans le sérum et le liquide d'ascites de patientes atteintes du syndrome sévère d'hyperstimulation ovarienne [20]. Chez le bovin, l'expression de l'angiogénine augmente avec le développement folliculaire et diminue au cours de la régression du corps jaune [15]. Ces observations suggèrent que l'angiogénine puisse jouer un rôle dans l'angiogenèse du cycle ovarien.

L'observation de la variation considérable de la concentration sérique de l'angiogénine chez les patients hospitalisés, quelle que soit leur pathologie, comparés aux sujets sains, et l'expression dominante par le foie de la protéine ont conduit K.A. Olson *et al.* [21] à tester l'hypothèse de l'existence d'un lien entre angiogénine et inflammation. Ces auteurs montrent que l'angiogénine est régulée comme une protéine de phase aiguë dans un modèle animal d'inflammation *in vivo*. *In vitro*, sur des cellules d'hépatome (HepG2), son expression est régulée comme celle des protéines de phase aiguë de classe 2. Elle est induite par l'interleukine 6 (IL6) ; cet effet est amplifié par la présence de dexaméthasone et aboli par la présence d'IL1 [22].

Dans des cellules cancéreuses de côlon comme les cellules HT29, l'expression des ARNm de l'angiogénine est induite par l'IL1beta et le *tumour necrosis factor* alpha (TNFalpha) [23]. Ces travaux montrent également le rôle de l'infiltration focale des macrophages et suggèrent que l'angiogenèse tumorale dans le cancer colorectal pourrait évoluer du fait de l'induction d'angiogénine par les cytokines pro-inflammatoires dérivées des macrophages infiltrés.

L'hypoxie est un facteur déterminant dans l'angiogenèse. L'expression de l'angiogénine est activée par l'hypoxie dans les cellules de mélanome malin et non dans les mélanocytes normaux [24]. L'hypoxie stimule également l'expression de l'angiogénine par les cellules humaines normales de la granulosa, *in vitro* [13].

Propriétés biologiques

Angiogenèse *in vivo* et *in vitro*

L'angiogénine est un inducteur puissant de la croissance des vaisseaux puisqu'il suffit de 0,5 ng (35 fmol) pour observer une angiogenèse dans la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet, 50 ng (3,5 pmol) dans la cornée de lapin, 100 ng (7 pmol) dans le ménisque du lapin et 1 nmol dans des essais cutanés chez la souris ([7] pour revue).

In vitro, l'angiogénine stimule l'activité fibrinolytique de cellules endothéliales (GM 7373) cultivées sur gel de fibrine et induit l'invasion des cellules endothéliales dans une matrice de matrigel. Elle régule positivement les ARNm des deux types d'activateurs du plasminogène de types urokinase (uPA) et tissulaire (tPA) ainsi que l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI1). Elle active la migration des cellules endothéliales dans des expériences de cicatrisation *in vitro* et induit l'organisation en capillaires des cellules endothéliales sur gel de collagène de type I ([7] pour revue).

Cibles de l'angiogénine

Les cibles actuellement mises en évidence sont les deux partenaires cellulaires vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) et la matrice extracellulaire. Les leucocytes polymorphonucléaires se révèlent également une cible importante.

* *Les cellules endothéliales vasculaires.* L'angiogénine est un faible mitogène pour certaines cellules endothéliales [25, 26]. Elle y induit des événements intracellulaires en stimulant la formation de diacylglycérol, et par activation de la phospholipase A2, la sécrétion de prostacycline, un puissant vasodilatateur et inhibiteur de l'agrégation plaquettaire. Elle présente une séquence d'adressage nucléaire

: Arg³¹-Arg-Arg-Gly-Leu³⁵ et peut être, dans certaines conditions, détectée au niveau du noyau [27]. Deux familles de sites de liaison sont présentes à la surface des cellules endothéliales [26, 28]. Des sites récepteurs de forte affinité de constante apparente de dissociation (Kd) de l'ordre du nanomolaire mobilisent 10 000 à 100 000 molécules par cellule. Des sites accepteurs de plus faible affinité, avec une Kd de 0,2 µM mobilisant plusieurs millions de molécules, sont associés aux composants péricellulaires [28]. Les tentatives de caractérisation des récepteurs de l'angiogénine ont permis d'identifier une composante de 49 kDa sur les cellules endothéliales de capillaire de cerveau bovin [25] et une composante de 170 kDa sur des cellules endothéliales humaines [26]. L'angiogénine se lie également à une protéine de surface de 42 kDa identifiée par son immunoréactivité comme l'alpha-actine de muscle lisse [29]. La capacité réceptrice des cellules endothéliales décroît au cours de leur croissance [25, 28] et les sites récepteurs ne sont plus détectés à confluence [26, 28]. Parmi les facteurs modulant les interactions de l'angiogénine avec les cellules endothéliales, la protamine, un inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de l'angiogenèse, inhibe sa fixation. L'héparine inhibe la fixation de l'angiogénine à un moindre degré. Cet effet peut être lié à la forte affinité de l'angiogénine pour l'héparine [30]. La fixation spécifique de l'angiogénine sur les cellules endothéliales est inhibée par le PRI [28] ; cependant, cette inhibition est levée en présence des ions cuivriques Cu⁺⁺, modulateurs de l'angiogenèse. La présence des ions Cu⁺⁺ ou Zn⁺⁺ augmente la fixation spécifique de l'angiogénine. Il faut noter qu'une molécule d'angiogénine fixe 2,4 atomes de cuivre ([7] pour revue). Cependant une question demeure : ces effecteurs exercent-ils un contrôle *in vivo* sur les mécanismes d'action de l'angiogénine ?

* *Les cellules vasculaires musculaires lisses.* L'angiogénine peut inhiber la prolifération des cellules musculaires lisses d'aorte [31]. Cette inhibition pourrait donc lever le contrôle négatif, décrit *in vitro*, des cellules musculaires lisses sur la croissance des cellules endothéliales. L'effet observé semble dépendre de la modulation phénotypique de ces cellules, différenciation phénotypique qui se produit *in vivo* lorsque l'endothélium ou la membrane basale est endommagé. Ces observations suggèrent un rôle potentiel de cette molécule dans l'homéostasie des parois vasculaires. Dans ces cellules, l'angiogénine active la phospholipase C ainsi qu'une estérification rapide du cholestérol. La recherche de récepteurs de surface a permis d'identifier deux familles de sites spécifiques de liaison [31]. Des récepteurs de forte affinité sont reconnus avec une Kd de 0,2 nM. Leur nombre varie avec la confluence cellulaire. Une large famille de sites d'interactions de plus faible affinité présente une Kd de 0,1 µM et implique des millions de molécules. Le marquage d'affinité de la surface des cellules musculaires lisses utilisant l'angiogénine radiomarquée met en évidence sept complexes spécifiques de forte affinité. La question demeure de savoir si ces molécules liant l'angiogénine sont des récepteurs *per se*, des molécules associées ou des éléments constitutifs d'une structure réceptrice multimérique. Dans les cellules musculaires lisses, l'angiogénine est internalisée et fragmentée. La particularité de cette internalisation est la résistance de la molécule à la dégradation avec une demi-vie de l'ordre de 12 heures. En plus de la protéine de 14,1 kDa, des fragments de 10,5 kDa, 8,7 kDa et 6,1 kDa sont générés [32]. La nature et le rôle de ces peptides sont à étudier.

* *Angiogénine et adhérence cellulaire.* L'angiogénine, adsorbée sur le plastique, facilite l'adhérence des cellules endothéliales, des fibroblastes et des cellules tumorales ([33] et références citées). Un protéoglycane de masse moléculaire apparente supérieure à 200 kDa a été isolé de la surface de cellules tumorales par chromatographie d'affinité sur angiogénine immobilisée [33]. Ce rôle de l'angiogénine dans l'adhérence cellulaire est important, car l'étape d'adhérence est nécessaire à la migration cellulaire des cellules endothéliales lors de l'ébauche de nouveaux vaisseaux sanguins et lors de la dissémination métastatique des cellules tumorales. L'angiogénine se fixe également spécifiquement à la matrice extracellulaire, constituant ainsi un réservoir extracellulaire [28].

* *Les leucocytes polynucléaires.* La concentration de l'angiogénine circulante est de l'ordre de 8-30 nM. À cette concentration, elle inhibe, *in vitro*, la dégranulation des leucocytes polynucléaires [34]. Cette propriété a été mise en évidence lors de son isolement d'hémodialysats de patients atteints d'urémie. Ces patients présentent une susceptibilité accrue aux infections et des anomalies dans leur fonction granulocytaire. Les auteurs suggèrent que l'angiogénine pourrait naturellement participer à un mécanisme endogène limitant la libération des contenus granulaires des leucocytes polynucléaires au

cours des réponses inflammatoires.

Angiogénine et pathologies

Cancers

L'angiogénine apparaît associée au développement tumoral. En effet, sa concentration sérique est augmentée chez les patients atteints de divers cancers (*tableau*). Son implication dans le développement tumoral est suggérée par les corrélations observées de l'augmentation de son expression tissulaire avec l'agressivité tumorale dans les cancers pancréatique [35], gastrique [36], urothélial [37], colorectal [38] et de l'augmentation de sa concentration sérique avec le grade de la tumeur de l'ovaire [39], de l'endomètre [40] et du col utérin [41]. Une expression accrue a été également détectée dans les tumeurs mammaires et localisée dans les cellules de carcinome [42]. Chez les patients atteints de carcinome urothélial, la concentration d'angiogénine sérique est plus élevée dans les cas de forme invasive et apparaît comme un marqueur de prédiction de la récurrence postopératoire [37]. L'angiogénine pourrait donc constituer un nouveau marqueur tumoral aux applications cliniques de pronostic et de thérapie anti-angiogénique. Son niveau d'action dans ce processus complexe reste à étudier. Les deux indices de son implication possible dans l'angiogénèse tumorale sont les suivants. L'augmentation de la vascularisation dans le stroma avoisinant des glandes néoplasiques exprimant l'angiogénine a été observée dans des adénocarcinomes du côlon [43]. L'intensité du marquage tissulaire de l'angiogénine a été corrélée au nombre de capillaires présents et à l'infiltration focale de macrophages dans le cancer humain colorectal [23]. Il faut noter que l'expansion des tumeurs solides est fréquemment corrélée à l'infiltration du tissu par des monocytes du sang périphérique. Cette infiltration dans les tissus tumoraux est associée à une angiogénèse accrue, et est alors corrélée à un pronostic défavorable dans le cancer du sein invasif [44] et à la malignité du mélanome [45].

La possibilité de réguler la production d'angiogénine est illustrée dans un modèle de souris où l'indométacine, un inhibiteur de la synthèse de prostaglandine, inhibe la production de PGE₂ par les tumeurs MGG 101, réduisant la taille des tumeurs et prolongeant la survie des animaux. Chez les animaux traités, l'expression tumorale des ARNm de l'angiogénine et du FGF2 diminue ainsi que la vascularisation du tissu tumoral [46].

Des inhibiteurs potentiels de l'angiogénine sont en cours d'études en tant que drogues anti-cancer. Ils ciblent différents domaines actifs de la molécule, soit les domaines de liaison au récepteur cellulaire ou à l'actine, soit les sous-sites catalytiques. En effet, l'intégrité du site catalytique de l'angiogénine est nécessaire, mais non suffisante, à l'expression de sa propriété angiogénique qui nécessite également un domaine d'interaction cellulaire. Des peptides complémentaires du site de liaison au récepteur de l'angiogénine et des peptides sélectionnés à partir d'une banque de phages exprimant de manière aléatoire ces peptides à la surface de leurs capsides inhibent à la fois l'interaction de l'angiogénine avec l'actine et la néovascularisation induite par l'angiogénine et par les cellules humaines d'adénocarcinome de prostate PC3 sécrétant l'angiogénine [47, 48]. Des oligodésoxynucléotides (aptamères) ont été sélectionnés à partir de banques aléatoires. Ils inhibent les activités enzymatique, mitogénique et angiogénique de l'angiogénine [49]. Deux autres molécules inhibent l'angiogénèse induite par l'angiogénine dans les modèles animaux : un antibiotique, la néomycine (un aminoglycoside) [50] et un peptide correspondant aux domaines K1-3 de l'angiostatine (un fragment du plasminogène). Ce peptide inhibe l'angiogénèse induite par l'angiogénine, le FGF2 et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) [51].

Dans le modèle de la souris athymique, les antagonistes de l'angiogénine (PRI [9], actine et anticorps monoclonaux neutralisants [52]) bloquent le développement des tumeurs humaines. Ces anticorps mAb26-2F et mAb36-u reconnaissent respectivement le segment de l'angiogénine 38-41 et Trp-89, et le segment 58-73 [52]. Des anticorps chimériques ou humanisés pourraient constituer une approche thérapeutique intéressante [53].

Une autre facette de cette recherche consiste à utiliser l'activité ribonucléolytique de la molécule comme outil thérapeutique pour détruire la cellule tumorale. Cette idée est issue de l'observation que d'autres membres de la super-famille de la RNase A sont connus pour leur activité antitumorale : la ribonucléase séminale bovine (BS-RNase, sans équivalent chez l'homme) et diverses ribonucléases de grenouille (RCE-RNase de *Rana catesbeiana*, RJE-RNase de *Rana japonica* et onconase de *Rana pipiens*) [6]. La puissance d'action de ces RNases est attribuée à l'impossibilité pour le PRI d'interagir avec elles. Ainsi la BS-RNase a une structure dimérique masquant le site de reconnaissance du PRI et les ribonucléases de batraciens ne se lient pas au PRI de mammifères. La toxicité de l'onconase pour les cellules tumorales est actuellement à l'essai clinique, en phase III chez des patients atteints de cancer mésothélial et en phase I-II chez des patients atteints de carcinome rénal métastatique. L'utilisation de l'activité ribonucléase d'une protéine humaine, non cytotoxique, faciliterait la tolérance. Cette protéine doit cependant cibler la cellule tumorale et ne pas être reconnue par le PRI [54]. Avec cette finalité, des constructions de protéines chimériques sont à l'étude couplant l'angiogénine à des ligands des cellules tumorales. Ainsi, la protéine de fusion de l'*epidermal growth factor* (EGF) et de l'angiogénine est cytotoxique *in vitro* pour les cellules tumorales humaines A431 riches en récepteurs à l'EGF [55]. Le récepteur à la transferrine est utilisé comme cible pour une protéine de fusion composée d'un anticorps chimérique souris/homme dirigé contre ce récepteur et de l'angiogénine. Cette protéine de fusion est cytotoxique *in vitro* pour les cellules tumorales de gliome SF539 et de cancer du sein MDA-MB-231^{mdr1} [56]. Le mécanisme d'action intracellulaire de ces chimères n'est pas connu.

Autres pathologies

L'étude de l'expression de l'angiogénine dans certaines pathologies a permis de mettre en évidence des variations pouvant donner des indications pronostiques.

Des taux élevés d'angiogénine dans le liquide amniotique (> 30 ng/ml) au second trimestre constituent un marqueur de naissance prématurée [12].

Les concentrations sériques d'angiogénine sont plus élevées chez les enfants et adolescents atteints de diabète insulino-dépendant sans qu'il y ait de différence notable avec la durée ou le contrôle de la maladie [61].

Finalement, comme nous l'avons noté précédemment, l'angiogénine est régulée comme une protéine de phase aiguë d'inflammation [21, 22] et sa concentration sérique varie considérablement chez tous les patients hospitalisés [21].

Enfin, il faut noter le travail de Hoshino *et al.* [62] soulignant l'importance de l'infiltration des cellules de l'inflammation dans l'angiogénèse. Ainsi les biopsies de muqueuse bronchique de patients asthmatiques présentent un nombre accru de cellules exprimant l'angiogénine, le FGF2 et le VEGF par rapport aux sujets sains. Il existe une corrélation entre la vascularisation du tissu et le nombre de cellules immunoréactives pour chacun de ces trois facteurs angiogéniques. Les cellules coexprimant ces facteurs sont des éosinophiles (MBP⁺), des mastocytes (AAI⁺), des cellules T (CD3⁺), des macrophages (CD68⁺) et des cellules CD34⁺.

CONCLUSION

Par les propriétés décrites, l'angiogénine peut intervenir à différents niveaux de la cascade angiogénique. Elle active les cellules endothéliales en induisant la synthèse de protéases conduisant à la dégradation de la membrane basale. Elle peut induire la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur organisation en capillaires. Elle peut également agir sur les cellules partenaires des cellules endothéliales, les cellules vasculaires musculaires lisses, en inhibant leur prolifération. Elle agit sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses *via* des récepteurs spécifiques et stimule dans ces cellules la production de médiateurs connus de la signalisation intracellulaire. L'originalité de ce facteur angiogénique est son activité ribonucléolytique : l'intégrité du site catalytique est nécessaire pour

l'expression de sa capacité angiogénique. Des questions demeurent : Quel partenaire moléculaire interagit avec le site enzymatique de l'angiogénine ? Comment intégrer cette activité dans la cascade angiogénique ?

Quels sont les mécanismes permettant de réguler l'activité de cette protéine présente dans le plasma à des concentrations 20 à 800 fois supérieures à celles nécessaires pour induire une angiogenèse *in vivo* dans les modèles animaux ou *in vitro* en culture cellulaire ? À partir des données acquises, trois niveaux de régulation potentiels apparaissent : 1) Le contrôle peut s'exercer au niveau de la réceptivité cellulaire. Cette réceptivité peut s'exprimer *via* la présence ou l'absence de récepteurs de haute affinité sur les cellules cibles. Ainsi, dans des conditions d'homéostasie vasculaire où les cellules sont quiescentes, les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses peuvent, comme en culture cellulaire à confluence, ne plus présenter de récepteurs de haute affinité. 2) La fonctionnalité du récepteur peut nécessiter l'association d'autres molécules membranaires ou cytoplasmiques. 3) La protéine elle-même peut nécessiter une activation. Finalement, une compartimentation stricte de l'angiogénine et de ses cibles pourrait rendre compatibles la forte concentration intravasculaire et la puissante capacité angiogénique de l'angiogénine. Ainsi, la molécule pourrait agir lorsque l'endothélium ou la membrane basale est endommagé et, par extravasation, jouer un rôle positif dans des événements de cicatrisation ou délétère dans des conditions pathologiques.

Quels sont les rôles physiologiques de l'angiogénine ? L'angiogénine pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse physiologique du cycle ovarien. Cependant, de par sa large distribution dans l'organisme, sa fonction physiologique pourrait ne pas se limiter à la néovascularisation. Régulée comme une protéine de phase aiguë de l'inflammation, elle semble impliquée dans des mécanismes inflammatoires et pourrait prendre part à la défense de l'organisme. Il faut noter que deux autres membres de la super-famille de la RNase pancréatique (RNase 1), l'*eosinophil-derived neurotoxin* (EDN ou RNase 2) et l'*eosinophil cationic protein* (ECP ou RNase 3), expriment une variété d'actions physiologiques associées à la défense de l'organisme : effets antibactérien et antiviral, effet helminthotoxique.

L'homéostasie vasculaire résulte d'un équilibre entre facteurs angiogéniques ou proangiogéniques et inhibiteurs. Les propriétés particulières de l'angiogénine permettent d'appréhender différemment le processus d'angiogenèse en offrant l'opportunité de découvrir de nouveaux points de contrôle de la cascade angiogénique et de nouvelles approches thérapeutiques.

Remerciements. Les travaux de recherche de notre groupe financé par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale, ont été au cours de ces années soutenus par l'Association pour la recherche sur le cancer, la Fondation de France, la Fondation pour la recherche médicale, le Groupement des entreprises françaises dans la lutte contre le cancer (Gefluc), le ministère de la Recherche et de la Technologie. N. Pavlov a bénéficié des soutiens de l'Association pour la recherche sur le cancer, de la Ligue nationale contre le cancer et de Novo Nordisk Pharmaceutique.

1. Pepper MS. Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *médecine/sciences* 2000 ; 16 : 1378-86.
2. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 ; 407 : 249-57.
3. Mattot V, Vandenbunder B. De nouveaux outils pour bloquer l'angiogenèse tumorale. *Bull Cancer* 1997 ; 84 : 447-50.
4. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 ; 407 : 242-8.
5. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, *et al.* Isolation and

characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 1985 ; 24 : 5480-6.

6. Sorrentino S. Human extracellular ribonucleases : multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol Life Sci* 1998 ; 54 : 785-94.

7. Badet J. Angiogenin. In: Bikfalvi A, ed. *Encyclopaedic reference of vascular biology & pathology*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, 2000 ; 16-29.

8. Hofsteenge J. Ribonuclease inhibitor. In : D'Alessio G, Riordan JF, eds. *Ribonucleases : structures and functions*. New York, Academic Press, 1997 ; 621-58.

9. Polakowski IJ, Lewis MK, Muthukkaruppan VR, Erdman B, Kubai L, Auerbach R. A ribonuclease inhibitor expresses anti-angiogenic properties and leads to reduced tumor growth in mice. *Am J Pathol* 1993 ; 143 : 507-17.

10. Futami J, Tsushima Y, Murato Y, Tada H, Sasaki J, Seno M, Yamada H. Tissue-specific expression of pancreatic-type RNases and RNase inhibitor in humans. *DNA Cell Biol* 1997 ; 16 : 413-9.

11. Shapiro R, Ruiz-Gutierrez M, Chen CZ. Analysis of the interactions of human ribonuclease inhibitor with angiogenin and ribonuclease A by mutagenesis : importance of inhibitor residues inside *versus* outside the C-terminal « hot spot ». *J Mol Biol* 2000 ; 302 : 497-519.

12. Spong CY, Ghidini A, Sherer DM, Pezzullo JC, Ossandon M, Eglinton GS. Angiogenin : a marker for preterm delivery in midtrimester amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol* 1997 ; 176 : 415-8.

13. Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, *et al.* Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the up-regulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 3352-5.

14. Pavlov N, Hatzi E, Moenner M, Bassaglia Y, Badet J. Angiogenin expression in the human placenta. *Placenta* 1999 ; 20 : A8.

15. Lee HS, Lee IS, Kang TC, Jeong GB, Chang SI. Angiogenin is involved in morphological changes and angiogenesis in the ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 257 : 182-6.

16. Rybak SM, Fett JW, Yao QZ, Vallee BL. Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1987 ; 146 : 1240-8.

17. Moenner M, Gusse M, Hatzi E, Badet J. The widespread expression of angiogenin in different human cells suggests a biological function not only related to angiogenesis. *Eur J Biochem* 1994 ; 226 : 483-90.

18. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Giannaki G, Rizos D, Phocas I. Changes of angiogenin serum concentrations in the perinatal period. *Pediatr Res* 1997 ; 41 : 909-11.

19. Weiner HL, Weiner LH, Swain JL. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science* 1987 ; 237 : 280-2.

20. Aboulghar MA, Mansour RT, Serour GI, Elhelw BA, Shaarawy M. Elevated concentrations of angiogenin in serum and ascitic fluid from patients with severe ovarian hyperstimulation syndrome. *Human Reproduction* 1998 ; 13 : 2068-71.

21. Olson KA, Verselis SJ, Fett JW. Angiogenin is regulated *in vivo* as an acute phase protein. *Biochem*

Biophys Res Commun 1998 ; 242 : 480-3.

22. Verselis SJ, Olson KA, Fett JW. Regulation of angiogenin expression in human HepG2 hepatoma cells by mediators of the acute-phase response. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 259 : 178-84.
23. Etoh T, Shibuta K, Barnard GF, Kitano S, Mori M. Angiogenin expression in human colorectal cancer : the role of focal macrophage infiltration. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 3545-51.
24. Hartmann A, Kunz M, Köstlin S, Gillitzer R, Toksoy A, Bröcker EB, Klein CE. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 1578-83.
25. Chamoux M, Dehouck MP, Fruchart JC, Spik G, Montreuil J, Cecchelli R. Characterization of angiogenin receptors on bovine brain capillary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991 ; 176 : 833-9.
26. Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 2204-9.
27. Moroianu J, Riordan JF. Identification of the nucleolar targeting signal of human angiogenin. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 203 : 1765-72.
28. Badet J, Soncin F, Guitton JD, Lamare O, Cartwright T, Barritault D. Specific binding of angiogenin to calf pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 8427-33.
29. Hu GF, Strydom DJ, Fett JW, Riordan JF, Vallee BL. Actin is a binding protein for angiogenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 1217-21.
30. Soncin F, Strydom DJ, Shapiro R. Interaction of heparin with human angiogenin. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 9818-24.
31. Hatzi E, Badet J. Expression of receptors for human angiogenin in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* 1999 ; 260 : 825-32.
32. Hatzi E, Bassaglia Y, Badet J. Internalization and processing of human angiogenin by cultured aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 ; 267 : 719-25.
33. Soncin F, Shapiro R, Fett JW. A cell-surface proteoglycan mediates human adenocarcinoma HT-29 cell adhesion to human angiogenin. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 8999-9005.
34. Tschesche H, Kopp C, Hörl WH, Hempelmann U. Inhibition of degranulation of polymorphonuclear leukocytes by angiogenin and its tryptic fragment. *J Biol Chem* 1994 ; 269 : 30274-80.
35. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Negri G, Oohara T, Berger HG. Increased angiogenin expression in pancreatic cancer is related to cancer aggressiveness. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 2703-6.
36. Shimoyama S, Kaminishi M. Increased angiogenin expression in gastric cancer correlated with cancer progression. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000 ; 126 : 468-74.
37. Miyake H, Hara I, Yamanaka K, Gohji K, Arakawa S, Kamidono S. Increased angiogenin expression in the tumor tissue and serum of urothelial carcinoma patients is related to disease progression and recurrence. *Cancer* 1999 ; 86 : 316-24.
38. Shimoyama S, Yamasaki K, Kawahara M, Kaminishi M. Increased serum angiogenin concentration

in colorectal cancer is correlated with cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999 ; 5 : 1125-30.

39. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Angiogenin, interleukins, and growth-factor levels in serum of patients with ovarian cancer : correlation with angiogenesis. *Cancer J Sci Am* 1996 ; 2 : 279-85.

40. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Serum levels of interleukins, growth factors and angiogenin in patients with endometrial cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997 ; 123 : 167-72.

41. Chopra V, Dinh TV, Hannigan EV. Circulating serum levels of cytokines and angiogenic factors in patients with cervical cancer. *Cancer Invest* 1998 ; 16 : 152-9.

42. Montero S, Guzman C, Cortés-Funes H, Colomer R. Angiogenin expression and prognosis in primary breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1998 ; 4 : 2161-8.

43. Li D, Bell J, Brown A, Berry CL. The observation of angiogenin and basic fibroblast growth factor gene expression in human colonic adenocarcinomas, gastric adenocarcinomas, and hepatocellular carcinomas. *J Pathol* 1994 ; 172 : 171-5.

44. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 4625-9.

45. Ono M, Torisu H, Fukushi JI, Nishie A, Kuwano M. Biological implications of macrophage infiltration in human tumor angiogenesis. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999 ; 43 : S69-71.

46. Lönnroth C, Svaninger G, Gelin J, Cahlin C, Iresjö BM, Cvetkovska E, *et al.* Effects related to indomethacin prolonged survival and decreased tumor growth in a mouse tumor model with cytokine dependent cancer cachexia. *Int J Oncol* 1995 ; 7 : 1405-13.

47. Gho YS, Chae CB. Anti-angiogenin activity of the peptides complementary to the receptor-binding site of angiogenin. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 24294-9.

48. Gho YS, Lee JE, Oh KS, Bae DG, Chae CB. Development of antiangiogenin peptide using a phage-displayed peptide library. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 3733-40.

49. Nobile V, Russo N, Hu GF, Riordan JF. Inhibition of human angiogenin by DNA aptamers : nuclear colocalization of an angiogenin-inhibitor complex. *Biochemistry* 1998 ; 37 : 6857-63.

50. Hu GF. Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 9791-5.

51. Kim JH, Kim JC, Shin SH, Chang SI, Lee HS, Chung SI. The inhibitory effects of recombinant plasminogen kringle 1-3 on the neovascularization of rabbit cornea induced by angiogenin, bFGF, and VEGF. *Exp Mol Med* 1999 ; 31 : 203-9.

52. Olson KA, Fett JW, French TC, Key ME, Vallee BL. Angiogenin antagonists prevent tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 442-6.

53. Piccoli R, Olson KA, Vallee BL, Fett JW. Chimeric anti-angiogenin antibody cAb 26-2F inhibits the formation of human breast cancer xenografts in athymic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 4579-83.

54. Suzuki M, Saxena SK, Boix E, Prill RJ, Vasandani VM, Ladner JE, *et al.* Engineering receptor-mediated cytotoxicity into human ribonucleases by steric blockade of inhibitor interaction. *Nature*

Biotechnol 1999 ; 17 : 265-70.

55. Yoon JM, Han SH, Kown OB, Kim SH, Park MH, Kim BK. Cloning and cytotoxicity of fusion proteins of EGF and angiogenin. *Life Sci* 1999 ; 64 : 1435-45.

56. Newton DL, Pollock D, DiTullio P, Echelard Y, Harvey M, Wilburn B, *et al.* Antitransferrin receptor antibody-RNase fusion protein expressed in the mammary gland of transgenic mice. *J Immunol Methods* 1999 ; 231 : 159-67.

57. Shimoyama S, Gansauge F, Gansauge S, Oohara T, Kaminishi M, Berger HG. Increased angiogenin expression in obstructive chronic pancreatitis surrounding pancreatic cancer but not in pure chronic pancreatitis. *Pancreas* 1999 ; 18 : 225-30.

58. Wechsel HW, Bichler KH, Feil G, Loeser W, Lahme S, Petri E. Renal cell carcinoma : relevance of angiogenetic factors. *Anticancer Res* 1999 ; 19 : 1537-40.

59. Barton DPJ, Cai A, Wendt K, Young M, Gamero A, De Cesare S. Angiogenic protein expression in advanced epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 1997 ; 3 : 1579-86.

60. Ugurel S, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 577-83.

61. Malamitsi-Puchner A, Sarandakou A, Dafogianni C, Tziotis J, Bartsocas CS. Serum angiogenin levels in children and adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus. *Pediatr Res* 1998 ; 43 : 798-800.

62. Hoshino M, Takahashi M, Aoike N. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2001 ; 107 : 295-301.