

Table des matières

ABREVIATIONS.....	7
INTRODUCTION	11
1 LE SYSTEME VASCULAIRE.....	11
1.1 LA VASCULOGENESE	12
1.2 L'ANGIOGENESE	14
1.2.1 La cellule endothéliale.....	14
1.2.2 L'endothélium	14
1.3 LES MECANISMES DE L'ANGIOGENESE	16
1.3.1 L'angiogenèse par intussusception	16
1.3.2 L'angiogenèse par bourgeonnement	17
1.3.2.1 Phase d'activation	18
1.3.2.2 Phase de maturation.....	21
1.4 PRINCIPAUX ACTEURS DE L'ANGIOGENESE.....	23
1.4.1 L'hypoxie	23
1.4.2 Les facteurs angiogènes.....	25
1.4.2.1 Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et ses récepteurs	25
1.4.2.1.1 Les ligands.....	25
1.4.2.1.2 Les récepteurs.....	28
1.4.2.2 La voie Notch/Dll4.....	31
1.4.2.3 Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2).....	33
1.4.2.4 Les intégrines, molécules d'adhésion.....	34
1.4.2.5 La VE-Cadhérine et les jonctions endothéliales	35
1.4.2.6 Autres facteurs et récepteurs impliqués dans l'angiogenèse	36
2 SIGNALISATION DES RECEPTEURS TYROSINE-KINASES : CAS PARTICULIER DU VEGFR-2	39
2.1 ACTIVATION DU REPECTEUR.....	39
2.2 REGULATION DE LA SIGNALISATION PAR ENDOCYTOSE	40
2.3 ROLE DES PROTEINES ADAPTATRICES.....	41
2.3.1 Recyclage	42
2.3.2 Dégradation	44
2.3.3 Clivage protéolytique	44
2.4 ROLES DES PROTEINES TRANSMEMBRANAIRES, CORECEPTEURS (NRP1, EPHB2, VEGFR-3...).....	44
2.4.1 L'EphrineB2 et les Héparanes sulfates	45
2.4.2 Les Neuropilines	46
2.5 ROLES DES PARTENAIRES CYTOPLASMIQUES.....	46
2.6 ROLES DES MOLECULES D'ADHESION (VE-CADHERINE, OCCLUDINE).....	46
2.7 SIGNALISATION INTRACELLULAIRE	47
2.8 VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES	47
2.8.1 Phosphorylation sur la tyrosine 1175.....	48
2.8.1.1 Voie de la kinase d'adhérence focale (FAK)	49
2.8.1.2 Voie ERK.....	49
2.8.1.2.1 Régulation de Ras	51
2.8.1.2.2 Régulation de Raf.....	54
2.8.2 Phosphorylation sur la tyrosine 1214.....	58
2.8.3 Phosphorylation sur la tyrosine 951.....	58
2.8.4 Phosphorylation sur les tyrosines 1054 et 1059.....	59
2.8.5 La voie des lipides.....	59
3 LES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENES.....	61

3.1	IMPLICATIONS DE L'ANGIOGENESE EN PATHOLOGIE.....	61
3.2	PRINCIPES DES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENES.....	63
3.3	LE VEGF, ACTEUR MAJEUR ET CIBLE DE L'ANGIOGENESE TUMORALE	65
3.3.1	<i>Inhibiteurs des tyrosine-kinases</i>	67
3.3.2	<i>Les VDAs (Vascular Disrupting Agents)</i>	68
3.3.3	<i>Autres cibles thérapeutiques</i>	70
3.4	LIMITATIONS DES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENES ACTUELS ET NECESSITE D'ALTERNATIVES	71
4	LES MODELES D'ANGIOGENESE IN VITRO ET IN VIVO	77
4.1	TESTS D'ANGIOGENESE IN VITRO	77
4.1.1	<i>Blessure d'une monocouche endothéliale</i>	78
4.1.2	<i>Test de migration en chambre de Boyden</i>	79
4.1.3	<i>Tubulogenèse sur matrice</i>	80
4.1.4	<i>Bourgeoisement tridimensionnel de sphéroïdes endothéliaux</i>	81
4.1.5	<i>Bourgeoisement endothélial après différenciation de cellules souches embryonnaires murines</i>	82
4.1.6	<i>Limites des tests d'angiogenèse in vitro</i>	83
4.2	TESTS D'ANGIOGENESE IN VIVO : IMPLANTATION D'EPONGE CHEZ DES SOURIS.....	84
4.3	AUTRES TESTS D'ANGIOGENESE IN VIVO.....	84
5	CRIBLAGE A HAUT DEBIT POUR L'IDENTIFICATION DE NOUVELLES MOLECULES A POTENTIEL THERAPEUTIQUE	87
5.1	INTRODUCTION AU CRIBLAGE	87
5.2	CRITERES D'ELIGIBILITE D'UN CRIBLAGE	89
5.3	CHOIX D'UNE CHIMIOTHEQUE	90
5.4	LES RESULTATS OBTENUS.....	91
5.5	PERSPECTIVES	93
	OBJECTIFS DU TRAVAIL	95
	RESULTATS.....	97
6	CRIBLAGE DE LA CHIMIOTHEQUE DE L'UNIVERSITE DE GRENOBLE	137
6.1	MISE AU POINT DU TEST.....	137
6.1.1	<i>Modèle cellulaire</i>	137
6.1.2	<i>Réalisation du test</i>	137
6.1.3	<i>Choix de la chimiothèque</i>	138
6.2	CRIBLAGE PRIMAIRE SUR LES HMEC-GFP, ET SECONDAIRE SUR LES 3T3-GFP	140
6.3	CARACTERISATION DE DEUX FAMILLES DE MOLECULES BIO-ACTIVES	141
6.4	ANALYSE DE L'ACTIVITE DE COB223 SUR DIFFERENTS TYPES ENDOTHELIAUX	145
6.5	EFFET SUR L'ANGIOGENESE IN VITRO ET IN VIVO	147
6.6	EFFET SUR LA TUMORIGENESE IN VIVO, MODELE TSA-LUC ET LLC/2-LUC.....	149
7	RECHERCHE DE LA CIBLE ET DU MECANISME D'ACTION	151
7.1	PENETRATION DE COB223 DANS LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES	152
7.2	EFFET INTRACELLULAIRE DE CO223	153
7.3	RECHERCHE D'UNE COMPETITION AVEC LE TRANSPORTEUR DES POLYAMINES	154
7.4	EFFET DE COB223 SUR LA SIGNALISATION INDUITE PAR LE VEGF	155
7.4.1	<i>Effet de COB223 sur les kinases</i>	155
7.4.2	<i>Test de compétition avec le VEGF</i>	156
7.4.3	<i>Effet de COB223 sur l'internalisation du VEGFR-2</i>	156
7.4.4	<i>Les partenaires du VEGFR-2 : cibles potentielles de COB223</i>	159
7.4.5	<i>Etude de la voie de signalisation ERK</i>	160

DISCUSSION	173
7.5 CONCLUSIONS.....	173
7.6 PERSPECTIVES.....	177
BIBLIOGRAPHIE.....	181
ANNEXES	203

Table des figures

FIGURE 1 : ORGANISATION SCHEMATIQUE DU SYSTEME VASCULAIRE.	11
FIGURE 2 : MORPHOLOGIE DES ARTERES ET DES VEINES.	12
FIGURE 3 : SCHEMA DU DEVELOPPEMENT DU RESEAU VASCULAIRE CHEZ L'EMBRYON ET LES FACTEURS ASSOCIES A SA FORMATION. ...	13
FIGURE 4 : LES TROIS TYPES D'ENDOTHELIUM : CONTINU, FENETRE ET DISCONTINU.	15
FIGURE 5 : ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION COUPE TRANSVERSALE D'UN VAISSEAU.	17
FIGURE 6 : ANGIOGENESE PAR INTUSSUSCEPTION COUPE LONGITUDINALE D'UN VAISSEAU.	17
FIGURE 7 : ANGIOGENESE PAR BOURGEONNEMENT : SELECTION DES « TIP CELLS ».	18
FIGURE 8 : CROISSANCE ET GUIDAGE DES CELLULES.	19
FIGURE 9 : ORGANISATION DES CELLULES ENDOTHELIALES AU COURS DE L'ANGIOGENESE.	20
FIGURE 10 : FUSION DE BOURGEONS ET FORMATION D'UNE LUMIERE	21
FIGURE 11 : PERFUSION ET MATURATION.	22
FIGURE 12 : RECOUVREMENT DES ARTERES ET VEINES.	23
FIGURE 13 : LES DIFFERENTES ISOFORMES DU VEGF.	26
FIGURE 14 : LES MEMBRES DE LA FAMILLE DU VEGF (A-B-C-D ET PLGF) ET SES RECEPTEURS VEGFR-1, 2,3 ET NRP1,2).	28
FIGURE 15 : SIGNALISATION DE NOTCH DANS LES « TIP » ET « STALK » CELLS.	32
FIGURE 16 : IMPLICATION DU FGF-2 DANS LES DIFFERENTES PHASES DE L'ANGIOGENESE.	34
FIGURE 17 : JONCTIONS ENDOTHELIALES.	35
FIGURE 18 : L'ANGIOGENESE TUMORALE ET LE ROLE DES DIFFERENTS FACTEURS AU COURS DU PROCESSUS.	38
FIGURE 19 : INTERNALISATION DU VEGFR-2.	41
FIGURE 20 : DEVENIR DU VEGFR-2 EN FONCTION DE SA LIAISON AUX DIFFERENTES PROTEINES ADAPTATRICES.	42
FIGURE 21 : MODIFICATION DU RECYCLAGE DU VEGFR-2 EN L'ABSENCE DE SYNECTINE.	43
FIGURE 22 : PARTENAIRES TRANSMEMBRANAIRES ET CYTOPLASMIQUES DU VEGFR-2.	45
FIGURE 23 : SIGNALISATION DU VEGFR-2 INDUITE PAR LE VEGF-A165.	48
FIGURE 24 : ACTIVATION DE LA VOIE ERK PAR LE FGF-2 ET LE VEGF-A DANS LES HUVEC.	51
FIGURE 25 : CYCLE D'ACTIVATION DE RAS.	53
FIGURE 26 : EFFECTEURS EN AVAL DE RAS ET LEURS ROLES DANS LA CELLULE.	54
FIGURE 27 : PHOSPHORYLATION DES DIFFERENTES FORMES DE RAF.	55
FIGURE 28 : LE CYCLE D'ACTIVATION/INACTIVATION DE RAF.	57
FIGURE 29 : ACTIVATEURS ET INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE.	61
FIGURE 30 : CHANGEMENTS DE VASCULARISATION DES TUMEURS LORS D'UN TRAITEMENT ANTI-ANGIOGENE.	64
FIGURE 31 : MECANISMES D'ACTION DES VDAs ET LEURS CIBLES.	69
FIGURE 32 : MECANISMES DE RESISTANCE AUX THERAPIES ANTI-ANGIOGENES.	73
FIGURE 33 : NOUVELLES CIBLES POTENTIELLES.	74
FIGURE 34 : ETAPES DE L'ANGIOGENESE ETUDIEES PAR LES TESTS D'ANGIOGENESE <i>IN VITRO</i>	77
FIGURE 35 : PHOTOGRAPHIES D'UN TEST DE BLESSURE SUR DES CELLULES HMVECd.	79
FIGURE 36 : PRINCIPE DU TEST DE MIGRATION EN CHAMBRE DE BOYDEN	79
FIGURE 37 : HUVEC FORMANT UN RESEAU DE TUBULES SUR MATRIGEL® (PHOTO A 24H).	80
FIGURE 38 : BOURGEONNEMENT D'UN SPHEROÏDE ENDOTHELIAL EN GEL DE COLLAGENE.	81
FIGURE 39 : MODELE EN UNE ETAPE DE DIFFERENCIATION ENDOTHELIALE DE CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES MURINES.	83
FIGURE 40 : ROBOT DE LA PLATEFORME DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT DU CEA –GRENOBLE.	87
FIGURE 41 : CELLULES HMEC-GFP.	137
FIGURE 42 : BLESSURE DES CELLULES HMEC-GFP PAR LE ROBOT DE CRIBLAGE.	138
FIGURE 43 : SCHEMA DU PROTOCOLE DE CRIBLAGE.	139
FIGURE 44 : PHENOTYPES OBSERVES AU COURS DU CRIBLAGE.	140
FIGURE 45 : STRUCTURE DE LA MOLECULE COB223.	144
FIGURE 46 : STRUCTURE DE LA MOLECULE COB227.	144
FIGURE 47 : ANALYSE PAR WB DE L'EFFET DE COB223 SUR LA VOIE ERK.	147
FIGURE 48 : LUMINESCENCE DES TUMEURS TSA-LUC DANS LES SOURIS NUDE.	150
FIGURE 49 : PENETRATION DE COB223 DANS LES CELLULES HMEC-1.	152

FIGURE 50 : PENETRATION DE COB223 DANS LES CELLULES 3T3.....	152
FIGURE 51 : PENETRATION DE COB223 VERSUS COB223-BSA DANS LES CELLULES HUVEC.	153
FIGURE 52 : PROTOCOLE D'ETUDE DE L'INTERNALISATION DU VEGFR-2.	157
FIGURE 53 : INTERNALISATION DU VEGFR-2 DANS LES CELLULES HUVEC EN PRESENCE DE COB.....	158
FIGURE 54 : ETUDE DES PARTENAIRES D'INTERNALISATION DU VEGFR-2.	160
FIGURE 55 : SCHEMA DE LA VOIE DE SIGNALISATION ERK INDUITE PAR LE VEGF-A ET FGF-2.....	161
FIGURE 56 : EFFET DE COB223 SUR LA VOIE DE SIGNALISATION ERK DANS LES HUVEC.	162
FIGURE 57 : EFFET DE COB223 SUR LA VOIE ERK DANS LES CELLULES 3T3.....	162
FIGURE 58 : EFFET DE COB223 SUR LA VOIE DE SIGNALISATION P38-MAPK DANS LES HUVEC.....	163
FIGURE 59 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION DE SRC DANS LES HUVEC.....	164
FIGURE 60 : ANALYSE PAR WESTERN BLOT DE LA PHOSPHORYLATION D'AKT DANS LES HUVEC.	165
FIGURE 61 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION DU VEGFR-2 DANS LES HUVEC.	165
FIGURE 62 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION DE LA PLC γ DANS LES HUVEC.	166
FIGURE 63 : IMPLICATION DE LA PKC DANS LA VOIE ERK INDUITE PAR LE VEGF-A DANS LES HUVEC.....	166
FIGURE 64 : EFFET DE COB223 SUR LA VOIE ERK EN AVAL DE LA PKC DANS LES HUVEC.....	167
FIGURE 65 : EFFET DE COB223 SUR MEK DANS LES HUVEC.	167
FIGURE 66 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION ERK1/2 INDUITE PAR L'ESTRADIOL DANS LES CELLULES CCL-39 RAF-ER.	168
FIGURE 67 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION DE RAF DANS LES HUVEC.	169
FIGURE 68 : EFFET DE COB223 SUR LA PHOSPHORYLATION ERK1/2 DANS LES CELLULES MCF10A-RASG12V.	170
FIGURE 69 : SCHEMA RECAPITULATIF DE L'EFFET DE COB223 SUR LA VOIE ERK.....	171
FIGURE 70 : VOIE D'ACTIVATION ERK PAR LE VEGF-A ET LE FGF-2 DANS LES HUVEC.....	175
FIGURE 71 : LISTE NON EXHAUSTIVE DE GAP ET DE GEF IMPLIQUES DANS LA REGULATION DE RAS.	177

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : LISTE DES GENES LIES A L'ANGIOGENESE INDUITS PAR HIF1 α	24
TABLEAU 2 : IMPLICATION DE L'ANGIOGENESE EN PATHOLOGIE.	62
TABLEAU 3 : IMPLICATION D'UNE VASCULARISATION INCOMPLETE EN PATHOLOGIE.	63
TABLEAU 4 : ESSAIS CLINIQUES EN COURS AVEC LE BEVACIZUMAB TM EN 2012.....	66
TABLEAU 5 : AGENTS ANTI-ANGIOGENES, LEURS CIBLES, LEURS APPLICATIONS CLINIQUES ET LE STADE DES ESSAIS.....	68
TABLEAU 6 : ESSAIS CLINIQUES EN COURS AVEC LES VDAS EN 2013.....	70
TABLEAU 7 : EXEMPLES DE CHIMIOTHEQUES.....	90
TABLEAU 8 : EIC50 DES COMPOSES TESTES SUR LES HMEC-GFP ET 3T3-GFP.	144
TABLEAU 9 : INHIBITION DE LA FERMETURE D'UNE BLESSURE PAR COB223. DETERMINATION DE L'IC50.....	145
TABLEAU 10 : TEST ANNEXIN-FITC SUR LES CELLULES HUVEC ET LLC/2 EN PRESENCE DE COB223.....	164

Table des graphiques

GRAPHIQUE 1 : NOMBRE DE MEDICAMENTS MIS SUR LE MARCHE AMERICAIN ENTRE 1997 ET 2008, ET LES INVESTISSEMENTS R&D DES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES AMERICAINES.....	88
GRAPHIQUE 2 : MEDICAMENTS EN ESSAIS CLINIQUES ET AUTORISES PAR LA FDA.....	88
GRAPHIQUE 3 : REPARTITION DES MEDICAMENTS MIS SUR LE MARCHE ENTRE 1999 ET 2008 EN FONCTION DE LEUR STRATEGIE DE DEVELOPPEMENT.....	92
GRAPHIQUE 4 : EFFET DE COB223 SUR LE CYCLE CELLULAIRE DE DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES.....	146
GRAPHIQUE 5 : EFFET DE COB223 SUR LA MIGRATION ENDOTHELIALE EN CHAMBRE DE BOYDEN.....	148
GRAPHIQUE 6 : EXPERIENCE DE XENOGREFE DANS DES SOURIS NUDE.....	149
GRAPHIQUE 7 : QUANTIFICATION DE LA LUMINESCENCE DES TUMEURS A J15.	150
GRAPHIQUE 8 : EFFET DE COB223 VERSUS COB223-BSA SUR LA FERMETURE DE BLESSURE.....	154

GRAPHIQUE 9 : COMPETITION DE COB223 AVEC LE TRANSPORTEUR DES POLYAMINES.	155
GRAPHIQUE 10 : COMPETITION DE COB223 AVEC LE VEGF DANS LES CELLULES HUVEC.	156
GRAPHIQUE 11 : QUANTIFICATION DES WESTERN BLOTS DE LA PHOSPHORYLATION DE ERK1/2.	162
GRAPHIQUE 12 : QUANTIFICATION DES WESTERN BLOTS P-ERK1/2 DANS LES 3T3.	163
GRAPHIQUE 13 : QUANTIFICATION DES WESTERN BLOTS DE LA PHOSPHORYLATION P38-MAPK.	164
GRAPHIQUE 14 : QUANTIFICATION DES WESTERN BLOTS DE LA PHOSPHORYLATION MEK.....	168

ABREVIATIONS

α -SMA: α Smooth Muscle Actin
ADN: acide désoxyribonucléique
AKT/PKB: Protein Kinase B
ALK: Activin receptor-Like Kinase
APPL: protéine adaptatrice à interaction phosphotyrosine
Ang: Angiopoïétin
ARE: Adenin Uridine-Rich Element
ARNm: Acide RiboNucleic messenger
ATP: Adenosin TriPhosphate
BMP: Bone Morphogenetic Protein
BSA: Bovine Serum Albumin
Bv8: Bombina variagata peptide 8
CAM: membrane choroïallantoïde
CD31/ PECAM-1: Cluster of Differentiation 31/ Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
CD: Cluster of Differentiation
CK2: Casein Kinase 2
DEP1: density-enhanced phosphatase 1
Dll: Delta Like Ligand
DMLA: Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO: Dimethyl Sulfoxyde
EC: endothelial cell
ECM: matrice extracellulaire
EEA1: Early Endosome Antigen-1
EEC: Ectoderme embryonnaire
EGF: Epidermal Growth Factor
eGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
EphB: Ephrin B
EPO: erythropoietin
eNOS: NO synthase endothéliale
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ESC: Embryonic Stem Cell
EXE: Ectoderme Extra-Embryonnaire
FAK: Focal Adhesion Kinase
FGF: Fibroblast Growth Factor
Flt: Fms-like tyrosine kinase
Flk1: Fetal Liver Kinase 1
GAP: GTPase Activating Protein
GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor

GRB2: Growth factor receptor-bound protein 2
GTPase: guanosine triphosphate hydrolase
HCS: High Content Screening
HGF: Hepatocyte Growth Factor
HIF1- α : Hypoxia Inducible Factor 1- α
HMEC: Human Microvascular Endothelial Cell
HMVECd: dermal Human Microvascular Endothelial Cell
HRE: Hypoxia Response Element
HSPG: Heparan Sulfate ProteoGlycan
HTS: High Throughput Screening
HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IC50: concentration inhibitrice médiane
IL: Interleukine
IgG: immunoglobuline
iQGAP: Ras GTPase-activating-like protein
iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase
IP3: Inositol 1,4,5 trisphosphate
IRM: Imagerie par Résonance Magnétique
Jag: Jagged
JAK: Janus activated kinase
JAM: Junctional Adhesion Molecule
Kd: constante de dissociation
kDa: kilo Dalton
KO: Knock-Out
kfl2 : Krüppel like Factor 2
LLC/2: Lewis Lung Carcinoma Cells/2
MAP-kinase ou MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase
MEK: Mitogen-Activated Protein kinase kinase
miR: micro ARN
MMP: Matrix Metallo Proteinase
MS/MS: Spectrométrie de masse
NG2: Neuron Glial Antigen-2
NICD: Notch Intracellular Domain
NO: Oxide Nitrique
NRP ou Np: Neuropiline
OCTs: Organic Cation Transporters
P38-MAPK: p38 Mitogen Activated Protein Kinase
PAK: p21 Protein Activated Kinase 1
PBS: Phosphate Buffer Saline
PDGF: Platelet-Derived Growth Factor
PHD: prolyl hydroxylase
PI3K: Phosphatidylinositol type 3 Kinase

PIP2: phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate
PKC: Protein Kinase C
PLC γ : Phospholipase C γ
PIGF: Placental Growth Factor
PPS: Pli Primitif Postérieur
PTP: phospho-tyrosine-phosphatase
Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras: Rat sarcoma virus
RBD: Ras Binding Domain
RGD: Arginine-Glycine-Acide Aspartique
RTKis: inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase
S1P: Sphingosine 1-Phosphate
Sck: SHC (Src homology and collagen homology)-related adaptor protein
SH2: Src-Homology domain-2
SHB2: SH2- domain-containing adaptor protein B
SHP2: PTP du domaine d'homologie 2 de SRC
SLCs: Solute Carrier Transporters
SPK1: Sphingosine Kinase-1
SOS: Son of Sevenless
SNARE: N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor ou syntaxine-6
SV40: Virus Simien 40
SVF/FCS : Sérum de veau foetal/Fetal Calf Serum
TAFs: Tumor Angiogenic Factors
TGF β : Transforming Growth Factor- β
Tie2: Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains
TIMP: Tissue Inhibitor Metallo Proteinase
Tis11b: TPA-Inducible Sequence 11b
TKIs: inhibiteurs des tyrosine-kinases
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TTP: TrisTetraProlin
TUNEL: dUTP nick end labeling
uPA: urokinase-type Plasminogen Activator
UTR: UnTranslated Region
VDAs: Vascular Disrupting Agents
VE-Cad: Vascular Endothelial Cadherin
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-1/Flt-1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1/ Fms-like tyrosine kinase-1
VEGFR-2/KDR/Flk1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/ Kinase insert Domain Receptor/ Fetal Liver Kinase
VE-PTP: Vascular-endothelial PTP
VHL: von Hippel-Lindau
ZO: Zona Occludens

INTRODUCTION

1 Le système vasculaire

L'arbre vasculaire est un réseau complexe et ramifié (Figure 1). Il comprend à la fois une voie afférente constituée par les artères. Les artères sont des vaisseaux sanguins de gros calibre qui distribuent le sang depuis le cœur vers les organes. Elles ont pour rôle d'apporter le sang et les nutriments dans la totalité de l'organisme. Les voies efférentes, constituées par les veines transportent quant à elles le sang et les déchets métaboliques depuis les organes vers le cœur.

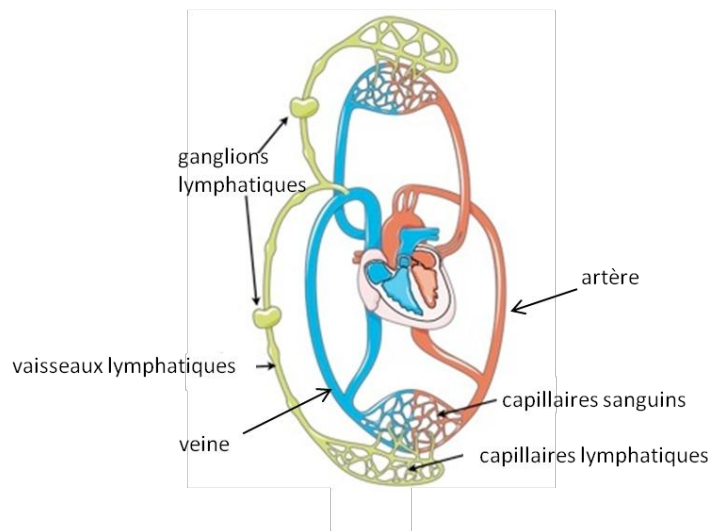


Figure 1 : Organisation schématique du système vasculaire.

Les artères sont constituées de trois couches [Adams and Alitalo, 2007]. La couche interne ou intima est un endothélium en contact avec le sang. La couche intermédiaire ou média est recouverte de cellules de muscle lisse qui lui confère son élasticité. Cette zone peut se dilater et se contracter pour adapter la pression du flux sanguin. La troisième couche périphérique rigide ou adventice est constituée de collagène.

Les veines ont une paroi fine et extensible et contrairement aux artères, elles sont recouvertes par peu de cellules de muscle lisses [Cleaver and Melton, 2003] (Figure 2). Les veines comportent également des valves constituées de tissu conjonctif et de cellules endothéliales qui orientent le flux sanguin et permettent le retour veineux des organes vers le cœur.

Le réseau lymphatique contribue également à la circulation des nutriments et des hormones, au drainage des fluides et participe au transport des cellules immunitaires. De plus, en fonction des besoins de l'organisme, le réseau vasculaire peut adapter le débit sanguin dirigé vers les tissus.

C'est par ces réseaux que différents messagers moléculaires tels que les hormones et les cytokines sont véhiculés et distribués dans le corps.

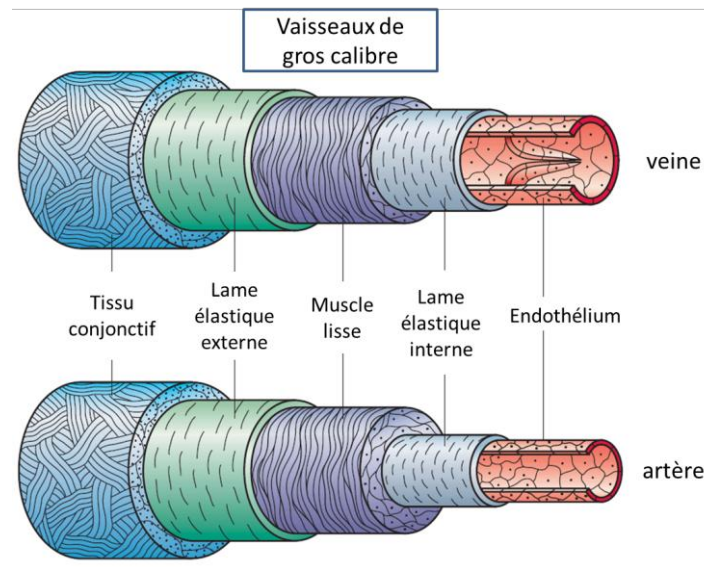


Figure 2 : Morphologie des artères et des veines.
(D'après [Cleaver and Melton, 2003])

Les deux mécanismes impliqués dans le développement du réseau vasculaire sont la vasculogénèse et l'angiogénèse.

1.1 La vasculogénèse

Durant l'embryogénèse, c'est à partir du développement du cœur à un stade très précoce (E6.5 chez la souris) que se forme le réseau vasculaire. Pendant la phase de vasculogénèse, l'assemblage en îlots de précurseurs endothéliaux dérivés du mésoderme (angioblastes) [Byrd and Grabel, 2004] donne naissance à un labyrinthe vasculaire primitif (Figure 3) [Risau and Flamme, 1995] [Coultas et al., 2005].

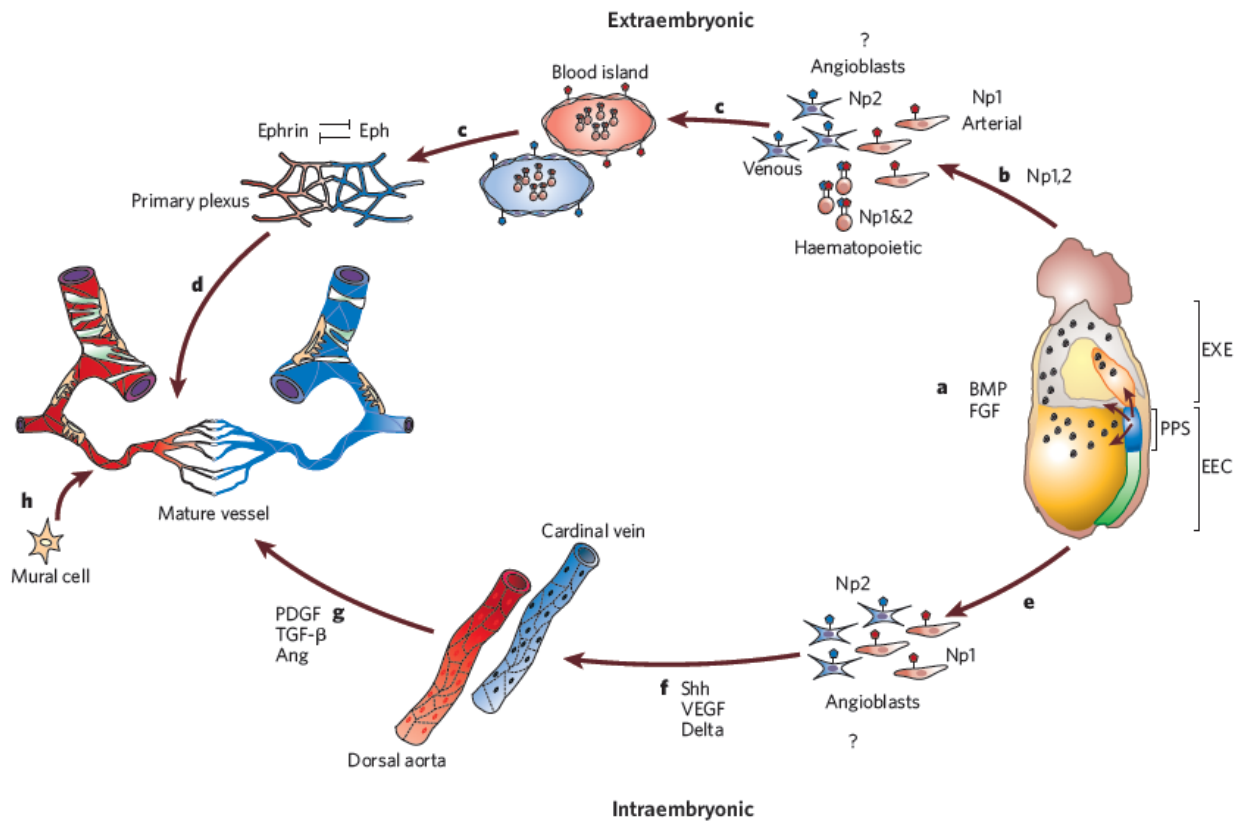


Figure 3 : Schéma du développement du réseau vasculaire chez l'embryon et les facteurs associés à sa formation.

(D'après [Coultas et al., 2005])

EEC : ectoderme embryonnaire ; EXE : ectoderme extra-embryonnaire; PPS : pli primitif postérieur (site d'apparition des progéniteurs vasculaires); Np : Neuropiline

Au cours du développement, le sac vitellin est le premier site d'apparition des vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales apparaissent dans les tissus mésodermiques des régions intra et extra-embryonnaires et dans des îlots sanguins du sac vitellin. Les hémangioblastes au centre de la structure du sac vitellin donnent naissance par leur différenciation aux progéniteurs hématopoïétiques qui composent les îlots sanguins. Les hémangioblastes à la périphérie de ces îlots se différencient en angioblastes et sont à l'origine des cellules endothéliales. Les facteurs de croissance tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) permettent la migration et l'organisation des cellules endothéliales qui vont s'anastomoser pour former le plexus capillaire primaire.

Par ailleurs, au niveau du mésoderme embryonnaire, les cellules endothéliales issues de la différenciation des angioblastes migrent et forment les principaux vaisseaux de l'embryon : l'aorte et la veine cardinale. Par la suite, ces deux sites de vasculogenèse (embryonnaire et du sac vitellin) se connectent pour former un réseau vasculaire composé de tubes endothéliaux intra et extra-embryonnaires. Durant cette phase embryonnaire, le réseau vasculaire est relativement instable. Il va progressivement se développer et se ramifier,

s'étendre dans tout l'organisme et se stabiliser. Ce sont les premiers battements du cœur qui initient la circulation sanguine. Ceci entraîne le remodelage de ce plexus vasculaire primaire en un arbre vasculaire hiérarchisé composé d'artères, de veines et de capillaires.

1.2 L'angiogenèse

1.2.1 La cellule endothéliale

La cellule endothéliale est le premier acteur de l'angiogenèse. Sa plasticité cellulaire lui permet d'acquérir des phénotypes différents en fonction des signaux qu'elle perçoit.

Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent la paroi interne des vaisseaux lymphatiques et sanguins. Ces cellules constituent l'endothélium vasculaire, la paroi la plus interne des vaisseaux sanguins en contact direct avec le flux sanguin. Dans les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales sont aplaties, allongées dans le sens du flux sanguin, et constituent une monocouche jointive : l'endothélium [Aird, 2007a]. Les cellules endothéliales quiescentes ont une durée de vie longue (de l'ordre d'une année), elles sont longues d'une centaine de μm , large d'une dizaine et épaisse de $0,5 \mu\text{m}$. Elles sont également polarisées, la face apicale est dirigée vers la lumière du vaisseau alors que la face basale est quant à elle fixée à la lame basale qui lui confère une résistance mécanique.

1.2.2 L'endothélium

Dans l'organisme humain, l'endothélium couvre une surface importante de plusieurs centaines de m^2 de sorte que chaque cellule de chaque tissu ne se trouve qu'à quelques μm d'un capillaire sanguin. Il s'agit donc d'un tissu très abondant dans l'organisme qui constitue le réseau microvasculaire, particulièrement dense et extrêmement ramifié. Les capillaires fonctionnent comme une barrière entre le sang et les organes en permettant et contrôlant les échanges des molécules et des protéines. La perméabilité basale permet les échanges de petites molécules telles que l'eau, les gaz, et les solutés. Mais l'endothélium vasculaire présente une grande hétérogénéité histologique en fonction de l'environnement tissulaire.

On peut distinguer trois types différents d'endothélium en fonction du lit vasculaire, différant dans leur fenestration: continu, fenêtré et discontinu (ou sinusoidal) [Aird, 2007b] (Figure 4).

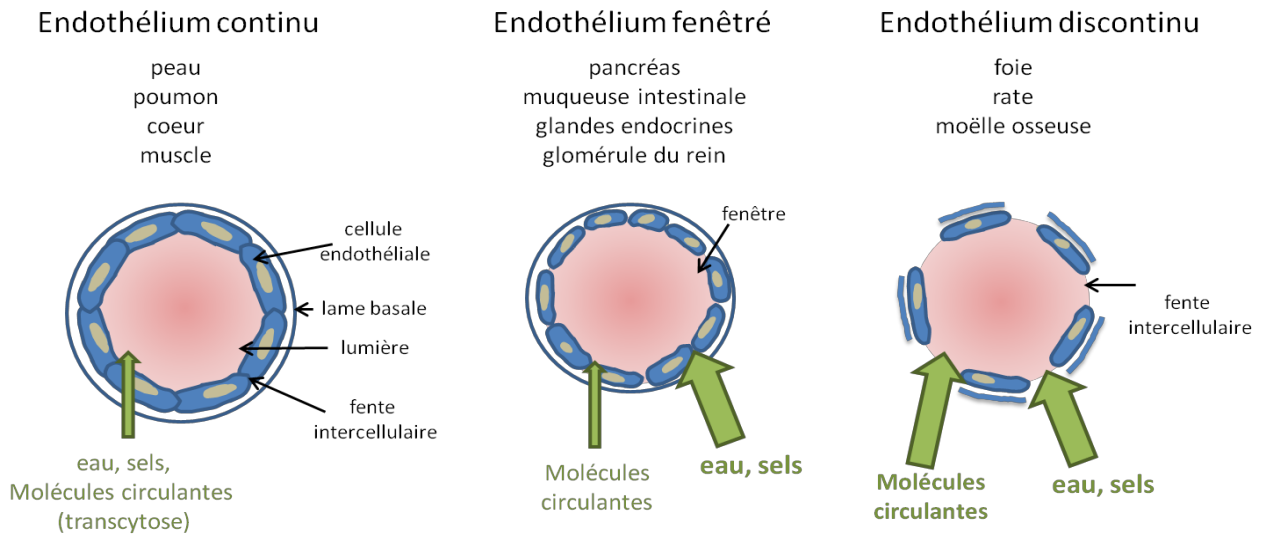


Figure 4 : Les trois types d'endothélium : continu, fenêtré et discontinu.
 La largeur des flèches vertes indique schématiquement le flux de solutés et de molécules.

Le lit capillaire continu est décrit comme tel car les cellules endothéliales qui le constituent sont jointives et laissent passer uniquement l'eau et les sels à travers des espaces intercellulaires, les macromolécules étant quant à elles transportées par des canaux transendothéliaux par transcytose. L'endothélium continu se retrouve dans les gros vaisseaux, les artérioles et les veinules qui alimentent les organes tels que le cœur, la peau, les muscles et les poumons.

L'endothélium fenêtré se trouve dans les glandes endocrines, les glomérules du rein, la muqueuse intestinale et le pancréas. La fonction de ces organes nécessite un passage important et efficace des fluides. Les cellules endothéliales de ce lit capillaire sont fixées sur une lame basale et présentent des pores (fenêtres) d'un diamètre de 60 à 80 nm qui permettent en plus du passage de l'eau et des solutés, la diffusion de certaines protéines et de macromolécules.

L'endothélium discontinu se retrouve dans la rate, la moelle osseuse et les sinusoides du foie [Nagy et al., 2008] où les échanges avec le sang sont importants. Contrairement aux deux précédents lits vasculaires, celui-ci se caractérise par une absence de lame basale et le contact direct de cellules épithéliales des parois vasculaires avec la lumière du vaisseau à travers des ouvertures de 30 à 40 μm .

Si la principale fonction de l'endothélium est donc de permettre les échanges entre les différents organes et le réseau sanguin, il a également d'autres fonctions [Aird, 2007a]. Il contrôle notamment l'hémostase par la sécrétion de facteurs pro ou anticoagulants, mais également le tonus vasomoteur dans les artérioles, l'angiogenèse, la pression osmotique tissulaire, la perméabilité vasculaire et est impliqué dans les processus inflammatoires.

A l'âge adulte, l'endothélium est quiescent. Mais les fonctions prolifératives et migratoires des cellules endothéliales peuvent être réactivées sous l'influence de facteurs environnementaux pro-angiogènes.

1.3 Les mécanismes de l'angiogenèse

Dans la phase d'angiogenèse qui suit la vasculogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux à partir du plexus vasculaire primitif permet le développement d'un réseau d'artères et de veines. L'angiogenèse se définit comme étant la formation de néo-vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant ([Risau, 1997]; [Geudens and Gerhardt, 2011]). Par la suite, le recrutement de péricytes (pour les capillaires et les petits vaisseaux) et de cellules de muscle lisse (pour les vaisseaux de gros calibre) permet d'assurer la stabilité et la perfusion de ces néo-vaisseaux. Si l'angiogenèse est un phénomène très actif au cours du développement, c'est un événement rare chez l'adulte où l'endothélium est quiescent avec un faible renouvellement des cellules endothéliales. Mais le processus angiogène peut être réactivé sous l'effet de facteurs pro-angiogènes. De manière physiologique, c'est le cas lors du cycle menstruel chez la femme, au cours des processus de cicatrisation, de réparation cellulaire (ischémie tissulaire, cardiaque ou des membres inférieurs) ou encore pendant la grossesse.

L'angiogenèse est également impliquée dans de nombreuses pathologies. Une angiogenèse est observée dans les cancers, dans le diabète, le psoriasis mais aussi dans certaines pathologies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et dans des pathologies auto-immunes. Dans ces conditions, les vaisseaux néoformés présentent des défauts d'organisation structurelle, et sont peu fonctionnels.

Deux mécanismes distincts d'angiogenèse peuvent avoir lieu :

L'angiogenèse par intussusception

L'angiogenèse par bourgeonnement

1.3.1 L'angiogenèse par intussusception

Dans ce système, les vaisseaux vont se séparer dans le sens de leur longueur, créant ainsi un nouveau vaisseau. La première étape de ce processus s'effectue lorsque des cellules endothéliales de bords opposés du vaisseau s'invaginent et entrent en contact (Figure 5). Les jonctions endothéliales vont être remaniées pour créer un espace entre ces cellules. Celui-ci est alors colonisé par des cellules fibroblastiques et des péricytes qui synthétisent de la matrice extracellulaire. Les cellules murales viennent stabiliser cet ensemble. Par opposition à l'angiogenèse bourgeonnante, l'allongement longitudinal de ces nouveaux vaisseaux requiert peu de prolifération des cellules endothéliales (Figure 6).

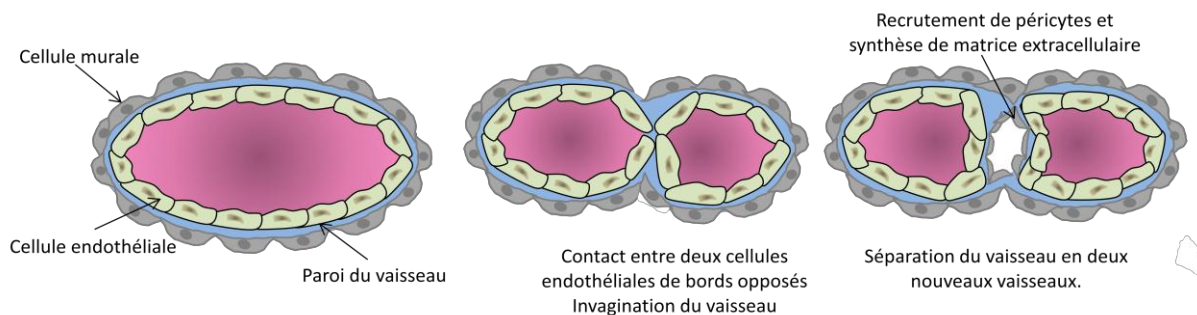


Figure 5 : Angiogenèse par intussusception coupe transversale d'un vaisseau.

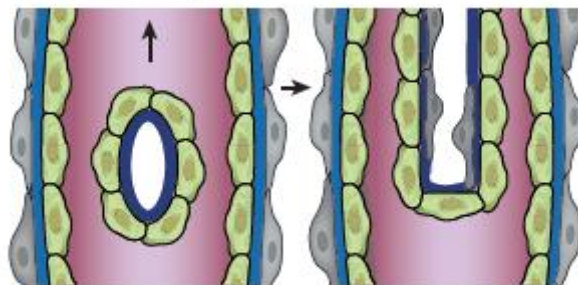


Figure 6 : Angiogenèse par intussusception coupe longitudinale d'un vaisseau.
(D'après [Carmeliet and Jain, 2011])

Ce remodelage du plexus vasculaire peut se dérouler de manière symétrique ou asymétrique et conduire à la formation de vaisseaux de diamètre inférieur à celui du vaisseau initial. Cette angiogenèse permet une grande ramification de l'arbre vasculaire préexistant. Dans un premier temps décrite essentiellement dans la circulation vasculaire pulmonaire et musculaire [Caduff et al., 1986], [Zhang et al., 2002], cette angiogenèse est maintenant également connue pour intervenir dans la progression tumorale [Hlushchuk et al., 2008].

1.3.2 L'angiogenèse par bourgeonnement

Les cellules endothéliales sont capables de proliférer et migrer en fonction des signaux extracellulaires qu'elles reçoivent. Elles communiquent entre elles, avec d'autres cellules et avec la matrice extracellulaire. A l'état physiologique chez l'adulte, les cellules endothéliales sont quiescentes. Cette stabilité est assurée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales (occludines, Zonula Occludens 1 et 2 (ZO1, 2), claudines, Junctional Adhesion Molecule (JAM)) et les jonctions adhérentes impliquant la VE-Cadhérine (Vascular Endothelial Cadherin) et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1). Les péricytes renforcent la stabilité du vaisseau en empêchant la prolifération des cellules

endothéliales et inhibant l'activité des facteurs tels que le VEGF-A, Notch, l'angiopoïétine-1 (Ang1) et le FGF-2.

L'angiogenèse par bourgeonnement est un processus qui se déroule en deux étapes principales. La première phase est celle d'activation au cours de laquelle les cellules endothéliales sortent de leur état de quiescence, prolifèrent et migrent afin de constituer un nouveau vaisseau. La seconde phase, dite de maturation, vise à stabiliser le vaisseau et à le rendre fonctionnel. L'ensemble de ces étapes et de ses principaux facteurs, seront discutés dans ce chapitre. Ce phénomène complexe implique différents acteurs. Au niveau cellulaire, les péricytes se détachent puis les cellules endothéliales migrent et prolifèrent lors de l'élongation des néo-vaisseaux. Les facteurs de croissance (VEGF-A, FGF-2, Delta-like 4 (Dll4)) régulent cette angiogenèse. Le processus est également régulé par d'autres facteurs (TGF β , Transforming Growth Factor β), PDGF (Platelet Derived Growth Factor)) qui assurent la stabilité des vaisseaux nouvellement formés.

1.3.2.1 Phase d'activation

➤ Bourgeonnement des cellules endothéliales

La phase d'activation se déclenche lorsque des cellules trop éloignées des vaisseaux et se trouvant de ce fait en hypoxie commencent à sécréter des facteurs pro-angiogéniques. Ces signaux de prolifération, migration et survie sont captés par les cellules endothéliales et les péricytes des vaisseaux les plus proches. En effet, de par la fonction même du vaisseau (le transport du sang oxygéné), les cellules endothéliales sont équipées de senseurs de l'oxygène et répondent à l'hypoxie par de profondes modifications cellulaires et des modifications importantes de leur profil transcriptionnel.

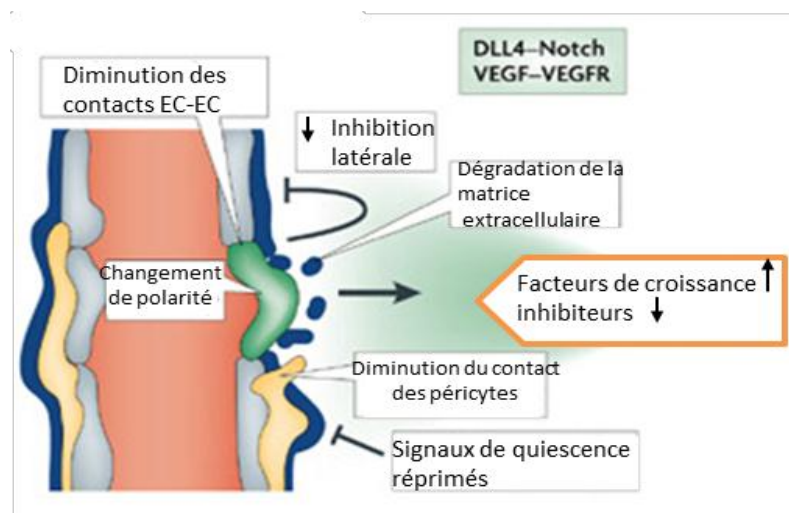


Figure 7 : Angiogenèse par bourgeonnement : sélection des « tip cells ». (Adapté d'après [Adams and Alitalo, 2007])

L'augmentation de la perméabilité vasculaire induite par l'action du VEGF et de l'oxyde nitrique (NO) conduit à la dégradation des jonctions serrées et la libération d'enzymes de dégradation de la membrane basale, les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Dans un premier temps, les péricytes matures, exprimant les marqueurs α -SMA (α -Smooth Muscle Actin), desmine et NG2 (Neuron Glial Antigen-2) se détachent et se séparent de la membrane basale. Lors de la dégradation de la matrice par les MMPs, des facteurs de croissance pro-angiogènes (VEGF-A, FGF-2, TGF β) et des cytokines présents dans la matrice extracellulaire sont libérés. Les MMPs facilitent la migration des cellules endothéliales en dégradant les adhésions cellules-cellules et cellules-matrices (Figure 7).

L'espace créé permet aux cellules endothéliales de proliférer et migrer. Au cours de cette phase, une cellule endothéliale se désolidarise de ses voisines. Elle acquiert le phénotype « tip cell », alors que chez ses voisines ce phénotype est réprimé.

➤ Croissance et guidage des bourgeons

Bien que toutes les cellules endothéliales soient activées par le VEGF-A environnant, seules quelques-unes d'entre elles vont migrer de manière orientée en suivant le gradient de VEGF-A. Une sélection parmi les cellules endothéliales s'opère sous le contrôle de la voie Notch pour déterminer la cellule « tip cell » qui se trouve au niveau du front de migration. La « tip cell » possède à son extrémité des filopodes composés de nombreux filaments d'actine dont la polymérisation et la dépolymérisation sont très rapides. Ces filopodes, capables de détecter des signaux attractifs ou répulsifs, vont s'orienter sur un axe de guidage dirigé vers les cellules émettrices des facteurs pro-angiogènes en suivant la matrice extracellulaire (Figure 8).

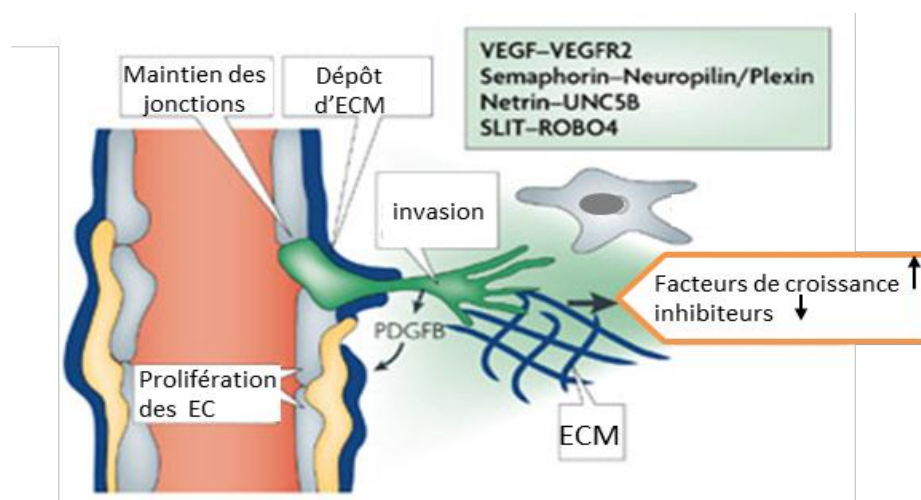


Figure 8 : Croissance et guidage des cellules.
 (Adapté d'après [Adams and Alitalo, 2007])
 EC: cellule endothéliale; ECM: matrice extracellulaire.

La « stalk cell », elle, est une cellule de la tige qui suit la « tip cell » en proliférant et migrant mais en gardant également un contact avec la membrane basale du vaisseau d'origine (Figure 9).

Les cellules endothéliales « tip cells » prolifèrent peu [Gerhardt et al., 2003]. Les « stalk cells », au contraire, prolifèrent de manière importante et permettent la croissance et l'élongation du bourgeon endothélial.

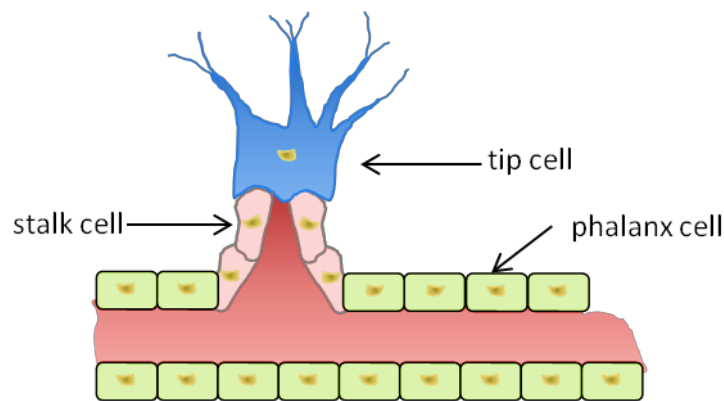


Figure 9 : Organisation des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse.

La compétition pour la fonction de « tip cell » est dynamique pendant toute la durée de l'élongation du vaisseau [Jakobsson et al., 2010]. L'échange entre « tip cell » et « stalk cell » est établi par la régulation de la voie de signalisation de Notch qui contrôle l'expression du récepteur du VEGF de type 2 (VEGFR-2) dans les cellules endothéliales. La régulation de cette voie d'activation sera détaillée par ailleurs dans cette introduction.

Comme indiqué dans la Figure 9, les « phalanx cells » sont les cellules endothéliales d'un vaisseau quiescent organisées en forme de pavés. Ce sont des cellules qui prolifèrent et migrent peu. Leur état de quiescence assure la stabilité des vaisseaux.

➤ Fusion de bourgeons et formation d'une lumière

Une fois la phase d'élongation terminée, les « stalk cells » ont comme rôle important la formation de la lumière vasculaire. Contrairement aux « tip cells » les « stalk cells » vont conserver leur polarisation baso-apicale et permettre la construction d'une lumière continue [Gerhardt and Betsholtz, 2003]; [Hellstrom et al., 2007a; Siekmann et al., 2008] (Figure 10).

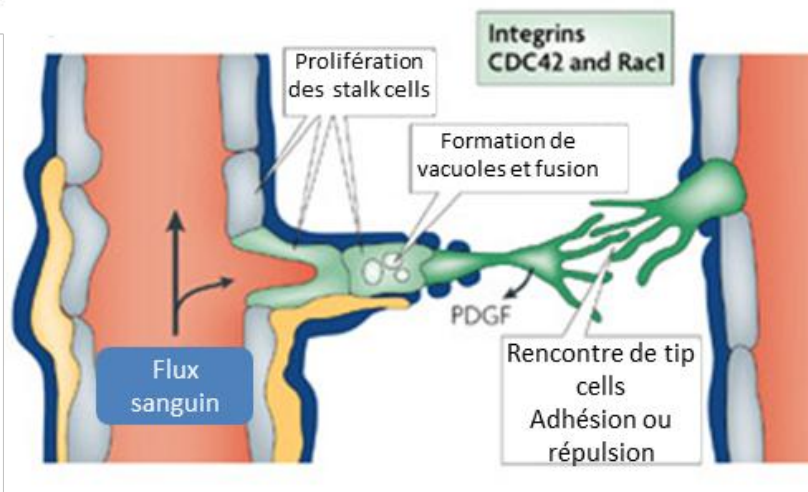


Figure 10 : Fusion de bourgeons et formation d'une lumière
(Adapté d'après [Adams and Alitalo, 2007])

Depuis quelques années, les études sur les progéniteurs endothéliaux circulants ont montré qu'ils pourraient également être recrutés et impliqués dans l'angiogenèse [Mancuso et al., 2006]. Des cellules de souris exprimant un marqueur génomique (globin/pBR322) ont été injectées dans d'autres souris dont l'hématopoïèse endogène avait été préalablement détruite. Un test d'angiogenèse sur éponge a ensuite été réalisé dans ces souris chimériques, et la proportion de cellules endothéliales d'origine hématopoïétiques quantifiée par hybridation in situ sur le marqueur génique globin/pBR322. Il a été ainsi démontré qu'environ 10% des cellules endothéliales formant les néo-vaisseaux proviennent des cellules circulantes hématopoïétiques [Crosby et al., 2000]. Par ailleurs, un autre groupe [Asahara et al., 1999] a montré que, lors des ischémies, le nombre de progéniteurs endothéliaux circulants était augmenté, confirmant leur rôle dans la formation des néo-vaisseaux. Le nombre de cellules endothéliales incorporé est faible mais leur importance résiderait dans le relargage de facteurs angiogènes de manière paracrine.

1.3.2.2 Phase de maturation

Cette étape est essentielle pour le bon fonctionnement du vaisseau. En effet, un défaut de stabilisation peut conduire à l'apoptose des cellules endothéliales et à la régression du néo-vaisseau. Au cours de ce processus, les cellules endothéliales stoppent leur migration et leur prolifération et commencent à synthétiser de la membrane basale. Lorsque deux « tip cells » se rencontrent, elles peuvent se joindre ou se repousser mutuellement. Deux « tip cells » jointes, en l'absence de signaux angiogènes, perdent leur mobilité, et les néo-vaisseaux s'anastomosent. Lorsque le contact a eu lieu, les jonctions serrées s'établissent. La VE-cadhérine impliquée dans ces jonctions est présente également

sur les filopodes des « tip cells » ce qui permettrait l'établissement rapide de nouvelles jonctions intercellulaires [Almagro et al., 2010]. La nouvelle jonction formée entre les deux vaisseaux est stabilisée par des macrophages qui forment un « pont » [Rymo et al., 2011] mais les mécanismes précis ne sont pas encore élucidés. Si les signaux pro-angiogènes sont encore présents tel qu'un faible taux d'oxygène, une nouvelle ramification peut débuter. Ce remodelage vasculaire conduit donc à l'apparition et la régression de certains vaisseaux (Figure 11).

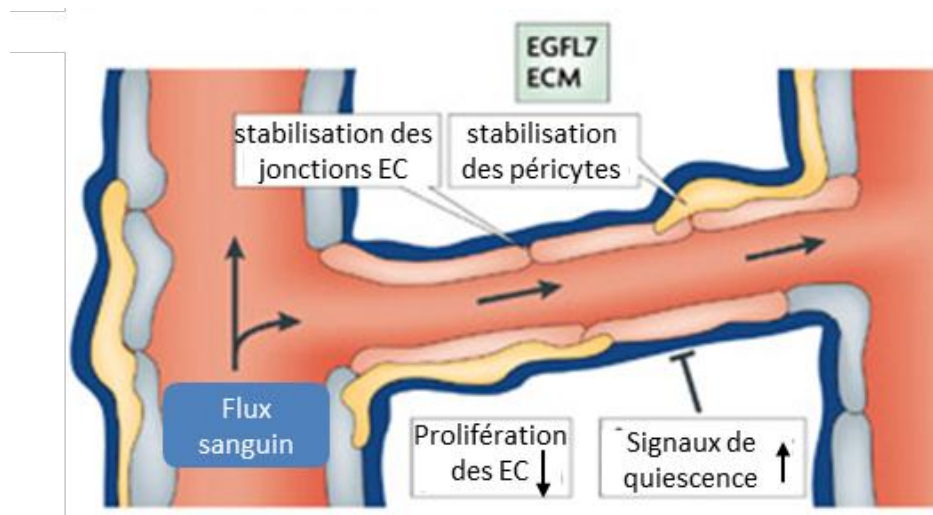


Figure 11 : Perfusion et maturation.
(Adapté d'après [Adams and Alitalo, 2007])

Le recrutement et la couverture des néo-vaisseaux par les péricytes assurent la maturation, et empêchent également leur régression lorsque l'environnement s'appauvrit en VEGF [Hughes and Chan-Ling, 2004]. Les péricytes sont au contact des cellules endothéliales et recouvrent les capillaires [Allt and Lawrenson, 2001]; [Sims, 1986] en une couche discontinue (Figure 12). Mais le mécanisme de protection des vaisseaux par les péricytes reste controversé. En effet, certaines études montrent que les vaisseaux recouverts de péricytes ne sont pas protégés de la régression induite par une inhibition du VEGF [Inai et al., 2004]. Les péricytes sont issus des cellules mésenchymateuses proches du vaisseau, des myofibroblastes et de la prolifération des péricytes existants. Mais, une partie des péricytes provient également de la moëlle osseuse. Les péricytes nouvellement recrutés stabilisent les vaisseaux en libérant les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases) qui vont inhiber les métalloprotéinases.

Les facteurs impliqués dans le recrutement des péricytes sont Ang1-Tie-2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains-2), PDGFB-PDGFRB, TGF β 1-ALK5 (Activin Like Kinase 5) et les composants de la voie Notch. Ang1 régule le recrutement des péricytes en induisant l'expression de cytokines. Les péricytes et les cellules de muscle lisse expriment le récepteur PDGFR β alors que les cellules endothéliales expriment le PDGF-BB, induisant

ainsi une boucle paracrine. Par ailleurs, PDGF-BB favorise le recrutement des progéniteurs mésenchymateux et leur différenciation en péricytes. Il permet également leur attachement aux néo-vaisseaux en l'absence de VEGF-A. Ce mécanisme permet d'assurer la stabilité et la quiescence du vaisseau.

Durant l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins sont remodelés en réponse au flux sanguin. Le flux joue un rôle important dans la stabilisation des vaisseaux. L'absence de circulation sanguine peut conduire à la régression d'un néo-vaisseau. Il a été montré dans un modèle de développement vasculaire chez le poisson-zèbre [Nicoli et al., 2010] que le flux induit l'expression du facteur de transcription klf2 (Krüppel like Factor 2). Ce facteur est nécessaire pour induire à son tour, l'expression d'un microARN spécifique des cellules endothéliales miR-126. miR-126 réprime l'expression de Spred1, un inhibiteur de la signalisation VEGF. Une autre étude [Watson et al., 2013] a montré également dans le poisson-zèbre que le flux supprime la signalisation de Notch en régulant négativement l'expression de Dll4. Cela démontre le rôle essentiel du flux sanguin dans le développement vasculaire.

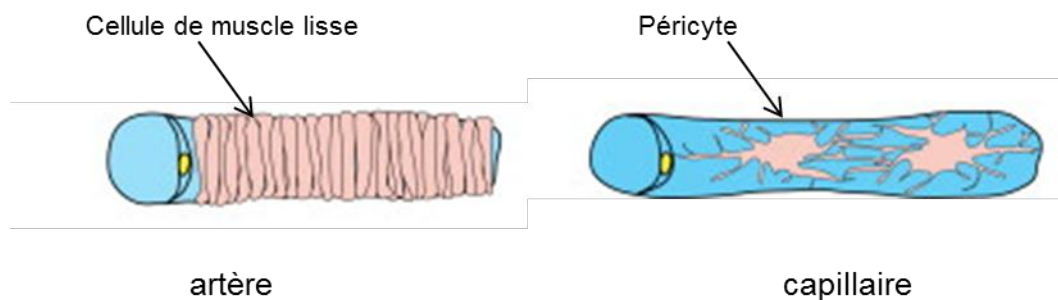


Figure 12 : Recouvrement des artères et veines.
(D'après [Armulik et al., 2011])

Après le recrutement des cellules péricytaire, l'endothélium devient quiescent et stable. L'expression du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales couvertes de péricytes est réprimée par la signalisation Notch. Le VEGF devient inactif sur les cellules endothéliales qui cessent toute prolifération et migration [Henderson et al., 2001; Taylor et al., 2002].

1.4 Principaux acteurs de l'angiogenèse

1.4.1 L'hypoxie

Les cellules qui, du fait de leur éloignement des vaisseaux sanguins, se trouvent en hypoxie, présentent un niveau élevé de la protéine HIF1 α (Hypoxia Inducible Factor- α). HIF1 est un facteur de transcription hétérodimérique constitué de deux sous-unités α et β , qui se fixent sur une séquence consensus appelée HRE (Hypoxia Response Element). La séquence consensus de liaison d'HIF1 α 5'-ACGTG-3' a été découverte lors du clonage du gène de

l'érythropoïétine (EPO), un gène activé par l'hypoxie. L'activité d'HIF1 α est régulée par les enzymes prolyl hydroxylases 1 et 2 (PHD1 et 2). En présence d'oxygène, ces enzymes hydroxylent HIF1 α sur deux résidus proline. L'hydroxylation de ces prolines permet la liaison du complexe de l'ubiquitine ligase VHL (von Hippel-Lindau). L'ubiquitination d'HIF1 α conduit à sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, le substrat des enzymes hydroxylases, l'oxygène, est limitant. L'ubiquitination d'HIF1 α diminue, et son niveau protéique augmente. HIF1 α s'associe avec HIF1 β et transloque alors dans le noyau pour activer les gènes cibles.

L'importance de ce facteur de transcription est démontrée par l'invalidation de son gène chez la souris qui est létale à E10.5. Les embryons présentent de grandes malformations vasculaires, cardiaques et neuronales.

L'expression de nombreux gènes possédant une ou plusieurs séquences HRE dans leur région 5' non traduite (5'UTR), est induite par HIF1 α . En réponse à l'hypoxie, HIF1 α régule, entre autres, l'expression de plusieurs gènes liés à l'angiogénèse (Tableau 1, liste non exhaustive).

Pro-angiogénique	Anti-angiogénique	Fonction
VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, angiopoïétine-2, Tie-2		Initiation de l'angiogénèse Perméabilité vasculaire Détachement de péricytes Dégradation de la membrane basale.
FGFs, PDGF-B, PlGF, intégrines, interleukines	Dll1-4 Thrombospondine-1 angiostatine	Formation de néo-vaisseaux Prolifération et migration des cellules endothéliales Prolifération et migration des péricytes
PDGF-BB, angiopoïétine-1, endothéline-1 iNOS endogline	vasoinhibine	Maturation Attachement des péricytes Dépôt de membrane basale Perméabilité vasculaire, vasoconstriction

Tableau 1 : liste des gènes liés à l'angiogénèse induits par HIF1 α .

C'est notamment le cas pour le gène du VEGF dont la transcription dans un tissu hypoxique est fortement induite par HIF1 α . Les cellules en hypoxie produisent du VEGF-A ce qui oriente la migration des cellules endothéliales du vaisseau adjacent et l'émergence des « tip cells ». Un autre gène dont la transcription est régulée par l'hypoxie est le gène codant pour iNOS (inducible Nitric Oxyde Synthase). L'augmentation de sa transcription permet la synthèse de monoxyde d'azote et qui favorise la vasodilatation des vaisseaux, inhibe l'apoptose et diminue l'expression de l'angiostatine [Matsunaga et al., 2002]. C'est également un facteur de survie des cellules endothéliales [Dimmeler et al., 1999]. Dans les cellules endothéliales, c'est plus particulièrement l'isoforme eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) qui favorise la perméabilité vasculaire. eNOS est également impliqué dans la migration, la prolifération et

la formation des vaisseaux capillaires *in vitro* et *in vivo*. Dans des souris KO invalidées pour le gène eNOS, l'effet angiogène du VEGF est altéré [Murohara et al., 1998]. Ce n'est pas le cas dans pour les souris invalidées pour le gène iNOS. L'action de eNOs se situe en conséquence en aval du VEGF et semble indispensable à l'action du VEGF-A contrairement à iNOS [Fukumura et al., 2001] [Cooke and Losordo, 2002] [Sonveaux et al., 2009].

1.4.2 Les facteurs angiogènes

Le vaisseau quiescent et plus particulièrement la cellule endothéliale sont soumis à de nombreux facteurs qui vont influencer le comportement phénotypique des cellules. En fonction de l'équilibre en facteurs pro ou anti-angiogènes, le réseau vasculaire va s'étendre ou régresser.

1.4.2.1 Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et ses récepteurs

1.4.2.1.1 Les ligands

Le VEGF est reconnu actuellement comme le facteur principal de l'angiogenèse [Folkman et al., 1971] [Leung et al., 1989] [Plouet et al., 1989]. Il s'agit en fait d'une famille qui comprend 5 membres : les VEGF-A, B, C, D et le PlGF (Placental Growth Factor).

- Le plus étudié est le VEGF-A couramment appelé VEGF. Le VEGF est une glycoprotéine homodimérique de poids moléculaire d'environ 45 kDa dont l'expression est fortement stimulée par l'hypoxie via HIF1- α . Son importance dans le développement embryonnaire est telle que l'inactivation d'un seul allèle du VEGF-A chez la souris est létale à E11-12 [Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996]. Le VEGF-A active la prolifération, la migration des cellules endothéliales aussi bien au cours de la vasculogenèse que de l'angiogenèse.

Le VEGF-A est sujet à épissage alternatif ce qui conduit à la production de différents variants protéiques. Actuellement, 9 isoformes sont décrites : 111, 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 et 206. Elles correspondent au nombre d'acides aminés présents dans la protéine qui a donc une taille allant de 34 à 46 kDa. L'exon 1 (codant pour la séquence de clivage permettant la sécrétion), les exons 2 à 5 (codant pour les domaines de liaison aux récepteurs) sont communs à toutes les isoformes. Les variants proviennent de l'épissage alternatif des exons 6 et 7. La région codée par ces exons est responsable de la fixation du VEGF aux héparanes sulfates (polysaccharides localisés sur la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire) via des acides aminés basiques.

En plus, de ces formes nommées VEGF_{xxxxa}, on distingue également des formes VEGF_{xxxxb} liées à l'épissage alternatif de l'exon 8 [Keyt et al., 1996]. Ces isoformes ont la même taille mais diffèrent sur leur domaine C terminal. Les isoformes 8b ont 6 acides aminés de la partie C terminale différents par rapport aux isoformes 8a (respectivement SLTRKD pour les isoformes 8b, et CDKPRR pour les isoformes 8a) [Cebe Suarez et al., 2006]. Cette modification impliquerait des changements dans les charges et la conformation de la structure de la protéine dans la queue C terminale (Figure 13). Ces isoformes VEGF_{xxxxb} auraient une activité anti-angiogène [Bates et al., 2002] [Merdzhanova et al., 2010] [Gu et al., 2013] en se liant au récepteur VEGFR-2 avec la même affinité que les isoformes VEGF_{xxxxa} mais empêcherait le recrutement du co-récepteur NRP1 (Neuropilin-1) nécessaire à sa signalisation.

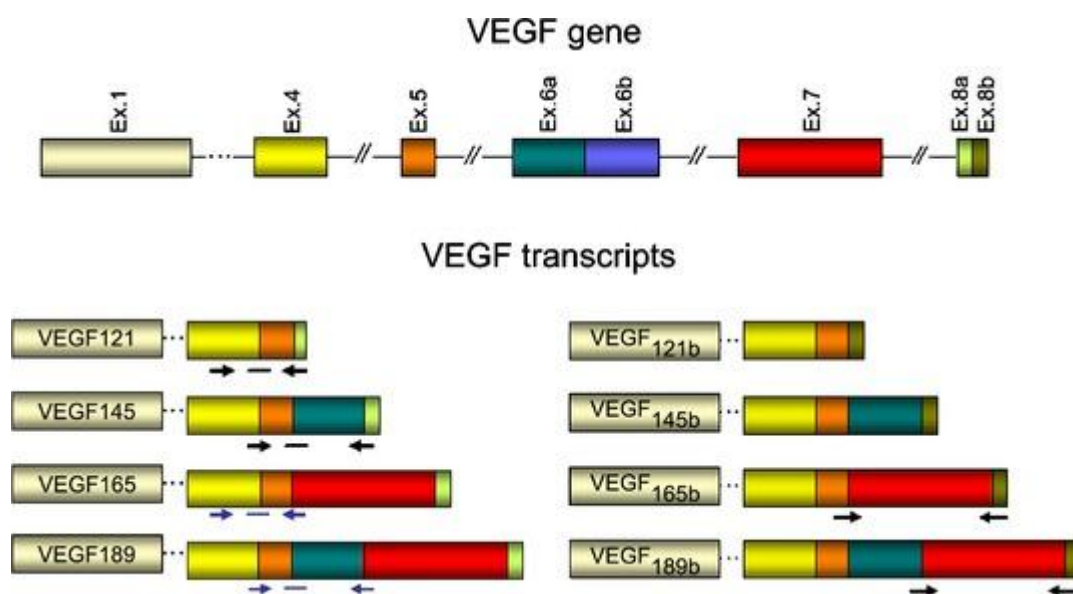


Figure 13 : Les différentes isoformes du VEGF.
(D'après [Elias and Dias, 2008])

En hypoxie, la plupart des types cellulaires peut produire du VEGF-165 (la forme la plus angiogène) et du VEGF-121 (la forme la plus diffusible car ne possédant pas de séquence basique de liaison aux héparanes sulfates).

Il existe d'autres membres de la famille VEGF qui, bien que se liant sur les récepteurs du VEGF (VEGFR) (Figure 14), exercent des fonctions différentes.

- Le VEGF-B a une homologie de 41% avec le VEGF-A. Il agirait de manière paracrine sur les cellules endothéliales via le VEGFR-1 sur lequel il se fixe. Le VEGF-B est notamment retrouvé dans les muscles, les os en développement, le tissu adipeux brun, le pancréas et les cardiomyocytes. Les souris déficientes pour le VEGF-B ne présentent pas de malformations majeures, elles sont viables et fertiles. Le VEGF-B

est un très faible inducteur de l'angiogenèse dont le rôle est controversé [Mould et al., 2005] [Silvestre et al., 2003] [Reichert et al., 2003] mais qui pourrait avoir un rôle angiogène dans la réparation de l'ischémie cardiaque [Li et al., 2008]. Comme le VEGF-C et le PlGF, le VEGF-B a un rôle dans le système nerveux en agissant comme un neuroprotecteur et régulant la neurogénèse chez l'adulte.

- Le VEGF-C et son récepteur le VEGFR-3 sont impliqués essentiellement dans la lymphangiogenèse mais il a néanmoins aussi un rôle dans l'angiogenèse. Il est assez similaire au VEGF-D. Leur faible homologie avec le VEGF-A (30%) est due à de grandes modifications dans leurs domaines N et C terminal. Les souris déficientes en VEGF-C meurent avant la naissance d'une accumulation de fluides dans les tissus [Karkkainen et al., 2004].
- Le VEGF-D est impliqué dans la stimulation de la lymphangiogenèse mais son rôle reste encore faiblement déterminé. Les souris déficientes pour le VEGF-D sont viables et ne présentent que quelques défauts lymphatiques dans les poumons suggérant que son rôle n'est pas essentiel dans le développement vasculaire lymphatique [Baldwin et al., 2005]. Ceci est confirmé par le double Knock-Out (KO) VEGF-C et VEGF-D, qui est viable et présente les mêmes caractéristiques que le KO VEGF-C [Haiko et al., 2008].
- Les Placental Growth Factors 1 à 4 (PlGF) ont été identifiés à l'origine dans le placenta ce qui leur a valu leurs noms [Yang et al., 2003b] [Cao et al., 1997]. Un déficit en PlGF est associé à la pré-éclampsie qui se caractérise par un défaut d'invasion des trophoblastes placentaires dans l'endomètre maternel. D'autres sites d'expression sont maintenant identifiés comme le cœur, les poumons, les muscles et la thyroïde. Les différentes isoformes peuvent se lier VEGFR-1 ou aux neuropilines 1 et 2 (NRP1, NRP2). Le PlGF est capable de stimuler l'angiogenèse dans certaines conditions pathologiques et de stabiliser les vaisseaux. Les souris déficientes pour PlGF sont viables et fertiles et ne présentent que des défauts mineurs dans le remodelage vasculaire de la rétine et une vascularisation moindre dans le corps lutéal [Tayade et al., 2007].

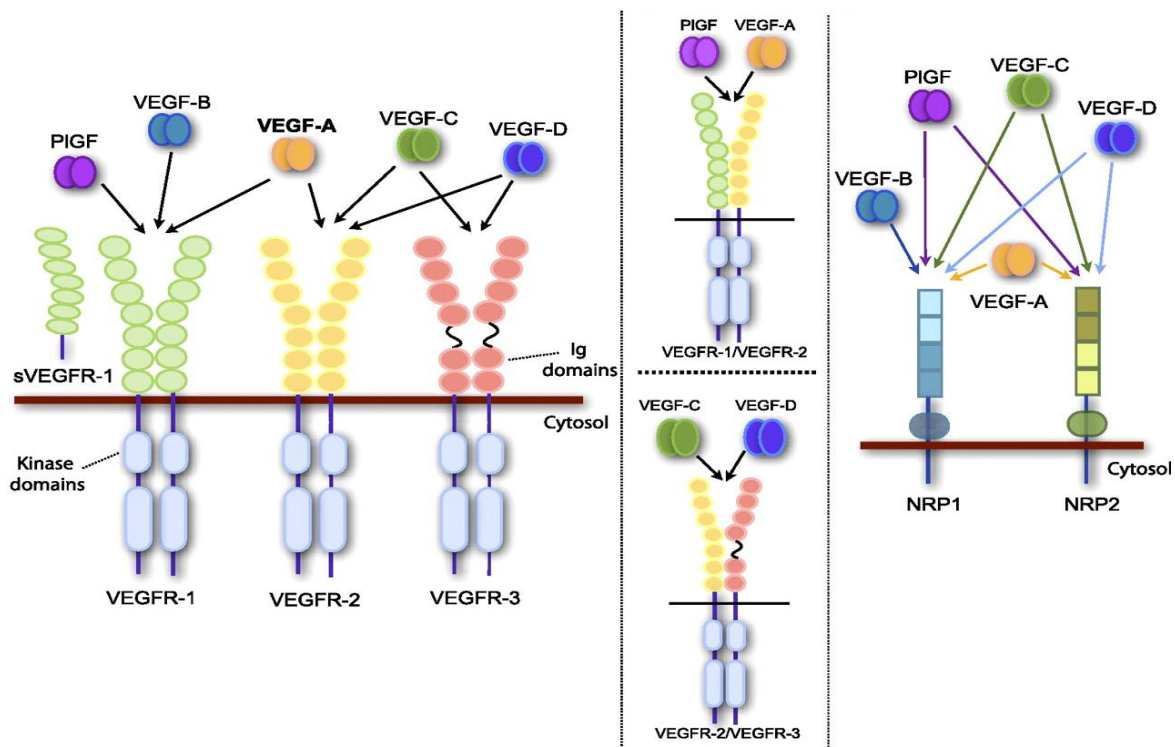


Figure 14 : Les membres de la famille du VEGF (A-B-C-D et PIGF) et ses récepteurs VEGFR-1, 2,3 et NRP1,2).

(D'après [Ruiz de Almodovar et al., 2009])

Le VEGF-A se lie aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2.

Le VEGF-B et le PIGF se lient uniquement au VEGFR-1.

Les VEGF-C et -D se lient aux VEGFR-3 et VEGFR-2.

Le VEGF et le PIGF peuvent aussi se lier au complexe hétérodimérique formé par le VEGFR-1 et 2, tout comme les VEGF-C et -D se lient aux hétérodimères formés par le VEGFR-2 et 3.

NRP1 et NRP2 peuvent agir comme corécepteurs pour certains complexes VEGF-VEGFR et moduler l'activation du récepteur et sa signalisation.

Le VEGF-A et tous les membres de la famille se lient à NRP1 et 2 sauf le VEGF-B qui se lie uniquement à NRP1.

1.4.2.1.2 Les récepteurs

Tous les membres de cette famille se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase qui possèdent un seul domaine transmembranaire. On distingue trois récepteurs : le VEGFR-1 ou Flt1 (Fms-like tyrosine kinase 1) ; le VEGFR-2 ou Flk1 (Fetal Liver Kinase 1) et le VEGFR-3 ou Flt4 (Fms-like tyrosine kinase 4). Les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 sont capables de former des homo ou des hétéro-dimères. Les trois VEGFRs possèdent des caractéristiques communes : il s'agit de glycoprotéines transmembranaires avec sept domaines extracellulaires de type immunoglobuline (IgG like). Le domaine intracellulaire possède l'activité kinase. L'activation des récepteurs nécessite leur dimérisation ce qui permet l'autophosphorylation et le recrutement de cofacteurs nécessaires à l'induction des différentes voies de signalisation.

Le VEGF-A peut se lier à deux récepteurs à activité tyrosine-kinase, les VEGFR-1 et VEGFR-2. Ces facteurs permettent l'initiation du bourgeonnement et la sélection des « tip cells » à travers la signalisation Notch/VEGFR-2.

✓ Expression des récepteurs

Les récepteurs sont exprimés de manière différentielle dans les différents tissus. Les VEGFR-1 et 2 sont exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins alors que le VEGFR-3 se trouve au niveau des vaisseaux lymphatiques.

✓ Rôles

- Le VEGFR-1 est connu pour avoir un rôle essentiellement dans l'organisation et le maintien des vaisseaux. Il lie le VEGF-A avec une forte affinité ($K_d \approx 10\text{-}20 \text{ pmol/L}$) dix fois supérieure à celle du VEGFR-2 ($K_d \approx 75\text{-}125 \text{ pmol/L}$) mais a une activité kinase dix fois plus faible [Bruns et al., 2009]. L'inactivation du gène du récepteur VEGFR-1 chez la souris induit la mort à E8.5 due à d'importants défauts vasculaires et d'hématopoïèse. VEGFR1 est également impliqué dans l'angiogenèse tumorale [Kearney et al., 2004] et l'activation des macrophages [Murakami et al., 2006]. Au cours de l'angiogenèse, VEGFR-1 est présenté comme étant un corécepteur du VEGFR-2, facilitant la perméabilité vasculaire. Il est fortement exprimé dans les « stalk cells » et est au contraire réprimé dans les « tip cells ». Le VEGFR-1 serait un régulateur négatif du VEGFR-2 en piégeant le VEGF-A de l'environnement et en limitant sa biodisponibilité. De plus, par épissage alternatif, on retrouve une forme soluble du domaine extracellulaire du VEGFR-1 (sFlt1 : soluble Flt1) capable de piéger également le VEGF sécrété par les cellules endothéliales [Koch et al., 2011]. Cette forme est particulièrement abondante dans le plasma des patientes prééclampsiques.
- Le VEGFR-2 est particulièrement impliqué dans l'angiogenèse. Le VEGFR-2 peut induire toutes les réponses biologiques stimulées par le VEGF : il est responsable de la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La délétion du gène VEGFR2 est létale précocement (E8.5) par l'absence de vaisseaux sanguins dans l'embryon. Contrairement au VEGFR-1, le VEGFR-2 a une forte activité kinase. Les voies de signalisation du VEGFR-2 impliquées au cours de l'angiogenèse seront développées dans le chapitre « Signalisation des récepteurs Tyrosine-kinase : cas particulier du VEGFR-2 ».
- Le VEGFR-3 est activé par le VEGF-C et -D. Il est impliqué dans la lymphangiogenèse. La liaison VEGF-C/VEGFR-3 est également impliquée dans le bourgeonnement vasculaire et la régulation de la migration des « tip cells » [Tammela et al., 2011]. Le VEGFR-3 a également un rôle dans le développement neuronal en induisant la

prolifération des précurseurs oligodendritiques. Le KO du VEGFR-3 est létale chez les souris qui meurent précocement à E10.5 avant l'émergence des vaisseaux lymphatiques [Dumont et al., 1998].

✓ Les corécepteurs

Comme indiqué sur le schéma précédent, on peut distinguer d'autres types de récepteurs pour les ligands de la famille VEGF : les Neuropilines. Les neuropilines ne peuvent pas induire seules une réponse biologique au VEGF, mais permettent de potentialiser le signal induit par ce facteur sur les récepteurs VEGFRs.

- NRP1 est une glycoprotéine transmembranaire dont le domaine extracellulaire permet la liaison à d'autres récepteurs membranaires et aux différents ligands (Semaphorine-3C et toutes les isoformes VEGF-A à l'exception du VEGF121).

Le KO de NRP1 chez la souris est létal à des stades embryonnaires précoces entre E10.5 et E14.5 en fonction des fonds génétiques, associé à une diminution importante de la croissance vasculaire notamment dans le cerveau et la moelle épinière ([Kawasaki et al., 1999] ; [Jones et al., 2008] ; [Gerhardt et al., 2004]). NRP1, qui n'a pas de domaine tyrosine-kinase est considéré comme un corécepteur (du VEGF, des plexines). C'est sur son domaine cytoplasmique court que se lie le VEGF-A. A l'état quiescent, 60% de NRP1 et de VEGFR-2 sont colocalisés à la surface cellulaire. Son rôle a été décrit dans l'internalisation du récepteur VEGFR-2 ([Wang et al., 2006]) : une fois lié à son ligand, NRP1 et VEGFR-2 sont associés. NRP1 recrute la synectine (ou GIPC1) (également impliquée dans l'internalisation) par le biais de son domaine cytoplasmique. L'internalisation de NRP1 déclenchée par la liaison du VEGF est clathrine-dépendante en opposition avec celle due à la liaison des sémaphorines qui est dépendante des radeaux lipidiques [Salikhova et al., 2008]. VEGFR-2 et NRP1 sont liés pendant l'endocytose et traversent ensemble les mêmes vésicules d'endocytose (les endosomes précoces). NRP1 potentialise aussi la phosphorylation du VEGFR-2.

- NRP2 est le deuxième membre de cette famille. Il présente 44% d'homologie avec NRP1. Le KO de NRP2 est viable mais il présente quant à lui des défauts de développement lymphatique [Yuan et al., 2002]. NRP2 est un corécepteur de VEGFR-3 qui contribue au bourgeonnement lymphatique en réponse au VEGF-C. La neutralisation de NRP2 dans les tumeurs réduit le réseau lymphatique tumoral sans affecter le réseau lymphatique physiologique [Caunt et al., 2008].

1.4.2.2 La voie Notch/Dll4

Les récepteurs de la famille Notch sont capables d'initier une signalisation hautement conservée entre les espèces et jouent des rôles très variés au cours du développement. Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs de type Notch (Notch1-4) et 5 ligands transmembranaires (Delta-like ou Dll1, 3, 4, et Jagged1 et 2). Les récepteurs Notch sont des protéines hétérodimériques constituées d'un domaine extracellulaire glycosylé, associé de manière non covalente à une protéine transmembranaire. La liaison d'une protéine de la famille Dll/Jag d'une cellule émettrice à un récepteur Notch d'une cellule avoisinante (cellule réceptrice) induit deux clivages successifs du récepteur Notch par des γ -secrétases intracellulaires et la libération de son domaine cytoplasmique dénommé NICD (Notch IntraCellular Domain). Le NICD ainsi généré transloque ensuite dans le noyau où il active les gènes cibles.

Les « tip cells » se caractérisent par une forte expression de VEGFR-2. Au contraire, les « stalk cells » expriment fortement VEGFR-1. L'activation du VEGFR-2 en réponse au VEGF induit la surexpression de Dll4, un des cinq ligands de Notch, dans les « tip cells ». En se liant à son récepteur Notch présent sur les « stalk cells » voisines, Dll4 réprime l'expression du VEGFR-2 et augmente l'expression du VEGFR-1 ([Williams et al., 2006]; [Hellstrom et al., 2007a]; [Suchting et al., 2007]). Parallèlement, sous l'action de Notch, le VEGFR-2 des « tip cells » diminue, et le taux de VEGFR-1 augmente. Les cellules endothéliales deviennent ainsi tour à tour « tip cells » ou « stalk cells ». A l'état « stalk cells », elles restent sensibles à l'action mitogène du VEGF et continuent à proliférer mais elles sont moins sensibles à son effet sur le bourgeonnement. Il y a donc une compétition dynamique entre les cellules endothéliales pour le phénotype « tip cell » qui dépend de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et 2 à la surface des cellules [Zhang et al., 2010]. La régulation de leur expression dépend de l'activité de la voie Notch.

Le niveau d'expression des facteurs du complexe Notch-Dll4-VEGFRs est constamment réévalué au niveau du front de migration des cellules endothéliales. Le groupe de Jakobsson [Jakobsson et al., 2010] a montré par des modélisations *in silico*, *in vitro* (bourgeonnement de corps embryoides) et *in vivo* (sur le développement vasculaire de la rétine chez la souris) qu'une « tip cell » reste à cette position pendant quatre heures avant d'être remplacée par une « stalk cell » voisine qui prend à son tour le phénotype « tip cell ». Le niveau d'expression des VEGFRs est lié à la signalisation de Notch dans des cellules adjacentes. L'expression des récepteurs VEGF régule à son tour l'expression du ligand de Notch : Dll4. Les deux voies de signalisation exercent de façon concomitante un rétro contrôle intercellulaire sur chacune des voies (Figure 15).

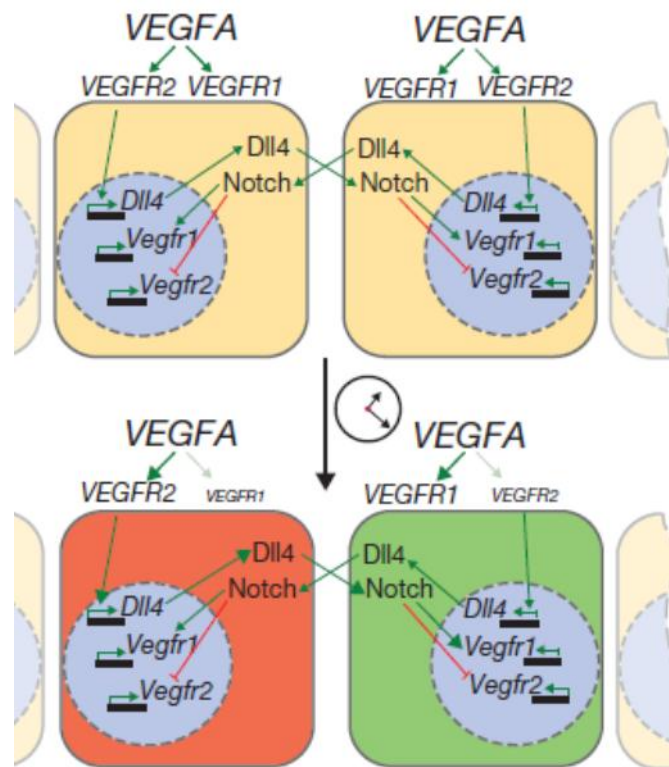


Figure 15 : Signalisation de NOTCH dans les « tip » et « stalk » cells.

(D'après [Jakobsson et al., 2010])

Représentation schématique de la régularisation des voies de signalisation NOTCH-Dll4-VEGFRs permettant aux cellules endothéliales (en jaune) d'acquérir le phénotype « tip cell » (en rouge) ou « stalk cell » (en vert).

Comme pour le VEGF, l'inactivation d'un seul allèle du gène Dll4 est létale chez la souris (seulement dans certains fonds génétiques) au stade embryonnaire. Cette mortalité est due à des défauts vasculaires importants avec notamment le développement d'un réseau très dense et peu fonctionnel, désorganisé, et une formation ectopique de « tip cells » [Duarte et al., 2004]. Cela a également été observé lors du développement post-natal de la rétine chez des souris dont l'expression de Dll4 était réprimée [Hellstrom et al., 2007b; Suchting et al., 2007]. Ces auteurs ont montré une forte induction du nombre de « tip cells » ainsi qu'une augmentation des branchements vasculaires.

Dans le laboratoire, nous avons montré que l'expression de Dll4 est régulée au niveau post-transcriptionnel par la protéine Tis11b (TPA-Inducible Sequence 11b). Tis11b est une protéine de la famille des tristétrapolines (TTP) dont les membres sont impliqués dans la stabilisation/dégradation des ARNm par liaison de leur double domaine à doigts de zinc sur des domaines de liaison ARE (AU-Rich Element) situés dans l'extrémité 3'-non traduite (3'-UTR) des ARNm cibles. Le rôle de Tis11b dans l'angiogenèse avait été préalablement démontré par son activité de dégradation de l'ARNm du VEGF. Nous avons confirmé son rôle dans l'angiogenèse en montrant que Tis11b régule l'expression de Dll4 dans les cellules

endothéliales sans altérer la stabilité de l'ARNm mais en agissant sur le choix du site de polyadénylation du transcrit. Tis11b se lierait sur un ARE localisé dans le site de polyadénylation [Desroches-Castan et al., 2011].

Par ailleurs, un autre ligand du récepteur Notch, Jagged-1, exprimé à la surface des « stalk cells » interfère avec la liaison de Notch à Dll4 et promeut la sélection des « tip cells » en entrant en compétition avec Dll4 [Hellstrom et al., 2007b]. Jag1 serait un antagoniste de Dll4 par une interaction en cis avec le récepteur Notch dans les « stalk cells » [Benedito et al., 2009].

La voie Dll4/Notch est responsable de la différenciation des cellules endothéliales en « tip cell » ou « stalk cell » mais elle est également impliquée dans la différenciation artério-veineuse. L'acquisition du phénotype artériel ou veineux est liée à l'expression différentielle des éphrines et de leurs récepteurs Eph (EphB2 dans les artères, EphB4 dans les veines) et de Notch1. En effet, les souris hétérozygotes pour Dll4 ont un déficit en EphrineB2 (marqueur artériel) et présentent des malformations artério-veineuses [Krebs et al., 2010] [Shutter et al., 2000]. Ces protéines impliquées dans les interactions cellules-cellules sont exprimées précocement dans les étapes de vasculogénèse.

Par ailleurs, chez les souris hétérozygotes pour Dll1, l'artériogénèse consécutive à une ischémie du membre inférieure est inexistante [Limboung et al., 2007].

1.4.2.3 Le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2)

Le FGF-2 (anciennement dénommé FGF basique) fait partie de la famille des facteurs de croissance se liant aux héparanes sulfates et qui comprend 23 membres, agissant via 4 récepteurs tyrosine kinase. Son activité pro-angiogène est médiée par sa liaison à différents récepteurs situés sur les cellules endothéliales : récepteurs tyrosine-kinase (FGFRs), intégrines et protéoglycanes (HSPGs) [Presta et al., 2005].

L'inactivation du récepteur 2 du FGF (FGFR-2) entraîne une létalité embryonnaire très précoce au stade de la gastrulation. Paradoxalement, l'inactivation du FGF-2, impliqué dans l'angiogénèse, n'induit pas de phénotype vasculaire marqué. Ceci est probablement dû à la redondance d'activité d'autres membres de la famille FGF [Deng et al., 1994; Miller, 2000; Yamaguchi et al., 1994]. Les cellules endothéliales expriment essentiellement le récepteur du FGF de type 1 (FGFR-1) [Bastaki et al., 1997] et en de plus faible proportion le récepteur FGFR-2. La stimulation du récepteur FGFR-1 se fait de manière paracrine (sécrétion par les cellules tumorales) et autocrine (par les cellules endothéliales) et induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales. L'autophosphorylation du récepteur est suivie de l'activation de la voie MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase ou MAPK). Parallèlement, le FGF-2 augmente la production des MMPs et de l'activateur du

plasminogène de type urokinase (uPA), qui transforme le plasminogène en plasmine, une sérine-protéase qui dégrade la fibrine. Pendant l'angiogenèse, la localisation de cette activité protéolytique se trouve au niveau du front de migration des néo-vaisseaux.

Le FGF-2 exerce également une fonction sur l'adhérence cellulaire. Il régule l'expression de différentes intégrines comme $\alpha\beta3$ et modifie aussi les jonctions intercellulaires en remodelant l'organisation des jonctions adhérentes via PECAM-1, VE-Cadhérine et plakoglobine.

De par ses multiples fonctions, le FGF-2 est donc impliqué dans les premières phases de l'angiogenèse, puis dans une étape plus tardive, lors de la maturation des vaisseaux et dans les relations cellules-cellules (Figure 16).

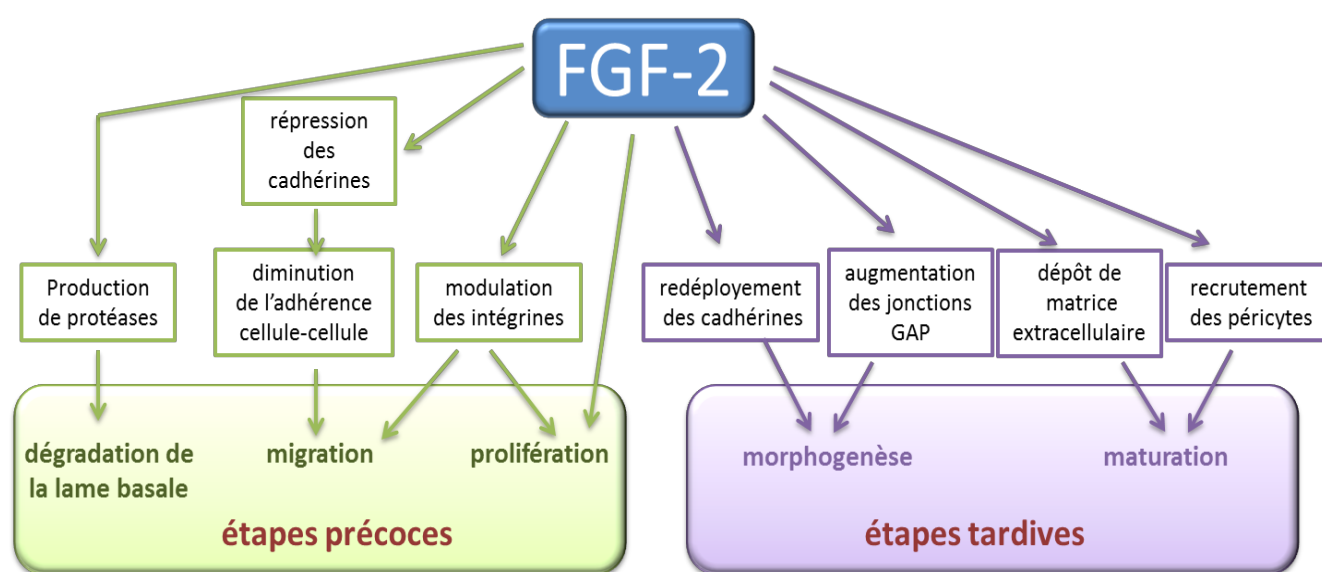


Figure 16 : Implication du FGF-2 dans les différentes phases de l'angiogenèse.

1.4.2.4 Les intégrines, molécules d'adhésion

La formation de néo-vaisseaux implique la migration des cellules endothéliales à travers le tissu. Ceci est rendu possible par la dégradation de la membrane basale (par des protéases) et la diminution de l'expression de facteurs permettant son maintien (intégrines) en partie sous l'action du FGF-2 comme décrit dans le paragraphe précédent. L'interaction entre cellules endothéliales et matrice extracellulaire est indispensable pour la migration des cellules. Les intégrines sont des hétérodimères de glycoprotéines composées de 2 sous-unités α et deux sous-unités β avec une extrémité N-terminale extracellulaire. Leur activité est calcium-dépendante. Au niveau de la lame basale et de la matrice extracellulaire, les intégrines interagissent avec les collagènes I et IV, la fibronectine et les laminines. Elles interagissent également de manière hétérophile avec certaines cadhérines.

Les intégrines dont l'expression est stimulée par le VEGF-A et le FGF-2 assurent le lien entre le cytosquelette des cellules endothéliales et la matrice extracellulaire.

1.4.2.5 La VE-Cadhérine et les jonctions endothéliales

Les cellules endothéliales sont en contact avec de nombreux types cellulaires. On peut définir plusieurs modèles d'interaction cellules-cellules. Les contacts intercellulaires homotypiques entre cellules endothéliales, et les contacts hétérotypiques entre cellules endothéliales et d'autres types cellulaires (péricytes ou leucocytes par exemple).

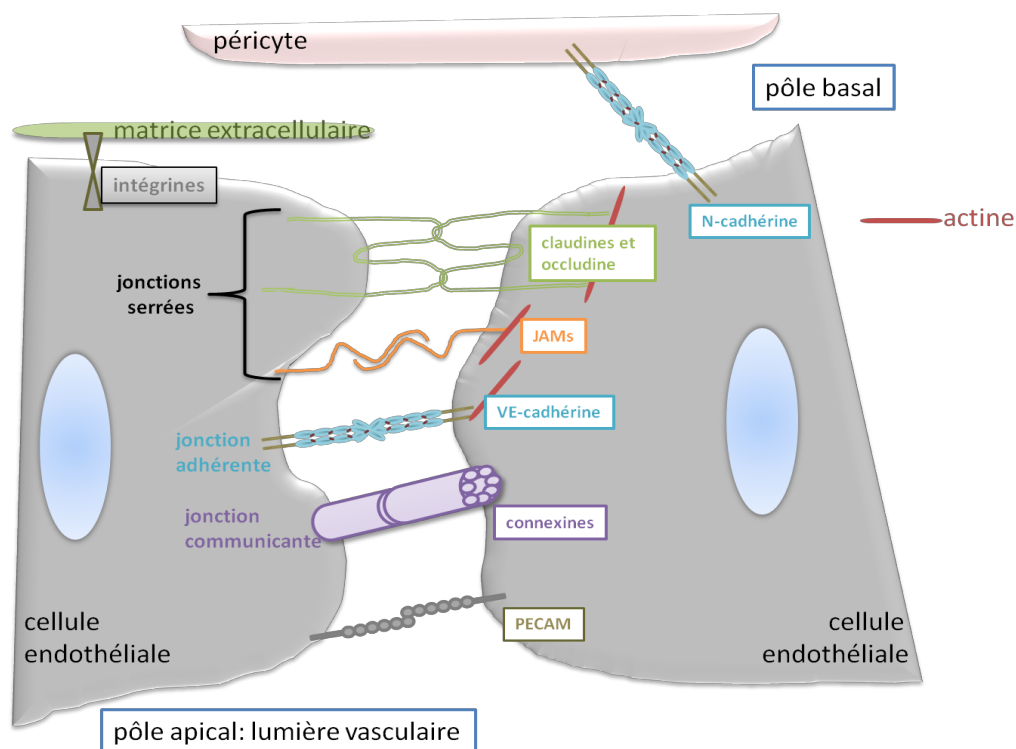


Figure 17 : Jonctions endothéliales.

Des jonctions inter-endothéliales de différentes natures sont décrites : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les jonctions communicantes (Figure 17).

Les jonctions serrées régulent la perméabilité vasculaire [Dejana, 1996; Dejana et al., 1995] et mettent en jeu les claudines, les occludines (protéines transmembranaires) et les JAMs. Cette interaction entre deux cellules par liaison de leurs protéines de jonction permet de maintenir une couche cellulaire étanche avec une diffusion faible des molécules. Ces jonctions sont particulièrement nombreuses dans les barrières hémato-encéphalique et hémato-testiculaire. Dans le cerveau et les testicules, l'endothélium est peu perméable aux petites molécules hydrophobes et aux nutriments et il présente une haute résistance électrique.

Les jonctions communicantes permettent le transfert direct d'ions ou de protéines d'une cellule à l'autre et sont constituées par des connexines qui forment des canaux de diffusion.

Les cellules endothéliales expriment une cadhérine spécifique, la VE-Cadhérine qui permet des interactions homophiles. Elle est impliquée dans les jonctions adhérentes qui assurent l'étanchéité de la paroi vasculaire.

1.4.2.6 *Autres facteurs et récepteurs impliqués dans l'angiogenèse*

D'autres interactions cellules-cellules sont décrites pour jouer un rôle dans le guidage (orientation et migration des cellules endothéliales), la progression ou la maturation des néo-vaisseaux. La Figure 18 résume les différentes étapes de l'angiogenèse et le rôle des facteurs impliqués.

✓ Phase d'activation :

- Les facteurs Nétrine 1 et 4, Slit-2, Semaphorine 3C, et leurs récepteurs associés, respectivement Robo4 et Unc5b, Neuropiline sont des facteurs de guidage qui permettent, lors de la migration des cellules, d'orienter leur déplacement par des phénomènes d'attraction-répulsion [Carmeliet and Tessier-Lavigne, 2005] [Eichmann et al., 2005]. Ce sont les mêmes protéines qui sont impliquées dans la guidance axonale.
- Lors de la phase d'activation, le système Ang2/Tie-2 induit le décollement des péricytes ou des cellules murales du vaisseau et accroît le relâchement de la matrice cellulaire.

✓ Phase de maturation :

- Le système Ang1/Tie-2 est impliqué dans la phase de maturation du vaisseau. Ang1 est exprimée par les cellules murales et stabilise les néo-vaisseaux en augmentant l'expression du récepteur Tie-2 dans ces cellules. Les protéines Ang1/Tie-2 permettent un renforcement des contacts entre les cellules. L'invalidation de ces gènes induit la mort à E9.5 (Tie-2) et E12.5 (Ang1) due à d'importants défauts vasculaires [Dumont et al., 1994; Suri et al., 1996].
- Le PDGF permet le recrutement, la prolifération et la migration des péricytes [Rossant and Howard, 2002]. Son invalidation [Lindahl et al., 1998] entraîne des défauts de maturation des vaisseaux (absence de prolifération et de différenciation des cellules de muscle lisse). Le PDGF est une glycoprotéine dimérique. Les dimères sont soit homodimériques par l'association de 2 chaînes AA, BB, CC ou DD, soit hétérodimériques par la liaison de 2 chaînes A et B. Le PDGF est produit par les plaquettes mais aussi par les cellules endothéliales, les cellules de muscle lisse, et les macrophages. Le PDGF-BB agit comme un facteur angiogène autocrine sur les cellules endothéliales [Risau, 1997]. C'est un facteur mitogène pour les cellules d'origine mésenchymateuse.

- Les peptides biologiques apparentés au TGF β constituent une famille de protéines à nœuds cystéiques qui comprend 37 membres. L'invalidation du gène TGF β 1 chez la souris est létale pour 50% des souriceaux à E10.5 ou à quelques semaines de vie [Kulkarni et al., 1993; Shull et al., 1992]. Les souris présentent des défauts de vascularisation et d'hématopoïèse. Le TGF β produit par les cellules endothéliales induit la formation de matrice par les cellules de muscle lisse [Amento et al., 1991] et la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes [Hirschi et al., 1998]. Il est sécrété sous une forme latente qui est activée au contact des cellules endothéliales avec les péricytes par les métalloprotéinases [Beck and D'Amore, 1997]. Le TGF β a une forte action chimioattractive sur les monocytes et les macrophages. Il stimule la production de facteurs pro-angiogènes comme le VEGF-A, le FGF-2, le Tumor-Necrosis Factor- α (TNF- α), et l'interleukine-1 α (IL1- α). Dans les cellules tumorales, il induit l'expression des métalloprotéinases MMP2, MMP-9, de PDGF-A et B par les cellules endothéliales et diminue l'expression des inhibiteurs des MMPs, les TIMPs [Derynck et al., 2001]. Il est alors considéré comme facteur pro-angiogène. En condition physiologique, le TGF β contribue à la stabilisation des néo-vaisseaux en stimulant la sécrétion de fibronectine et de protéoglycanes (héparanes sulfate, chondroïtine sulfate) par les cellules endothéliales et les cellules de muscle lisse. [Roberts and Sporn, 1989].
- Les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) appartiennent à la famille du TGF β . Elles comprennent 15 membres regroupés en fonction de leurs homologies de séquence et leurs fonctions. Des mutations de leur récepteurs induisent des pathologies vasculaires démontrant leur implication dans l'angiogenèse. Les BMPs sont rapportées comme étant des facteurs pro- ou anti-angiogènes. Les BMP2 et BMP4 ont des activités pro-angiogènes dans différents modèles d'angiogenèse et sur différents types de cellules endothéliales. Elles activent la prolifération, la migration et la formation de capillaires à la fois *in vivo* et *in vitro*. Ces BMPs sont donc impliquées dans la phase d'activation de l'angiogenèse. Par ailleurs, on distingue les BMP9 et BMP10 qui sont les ligands du récepteur ALK1. Ces BMPs inhibent *in vitro* la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, *in vivo*, BMP9 inhibe la vascularisation induite par le FGF-2 dans un modèle d'éponge. Ces deux BMPs sont impliquées dans la phase de maturation de l'angiogenèse. [David et al., 2009].

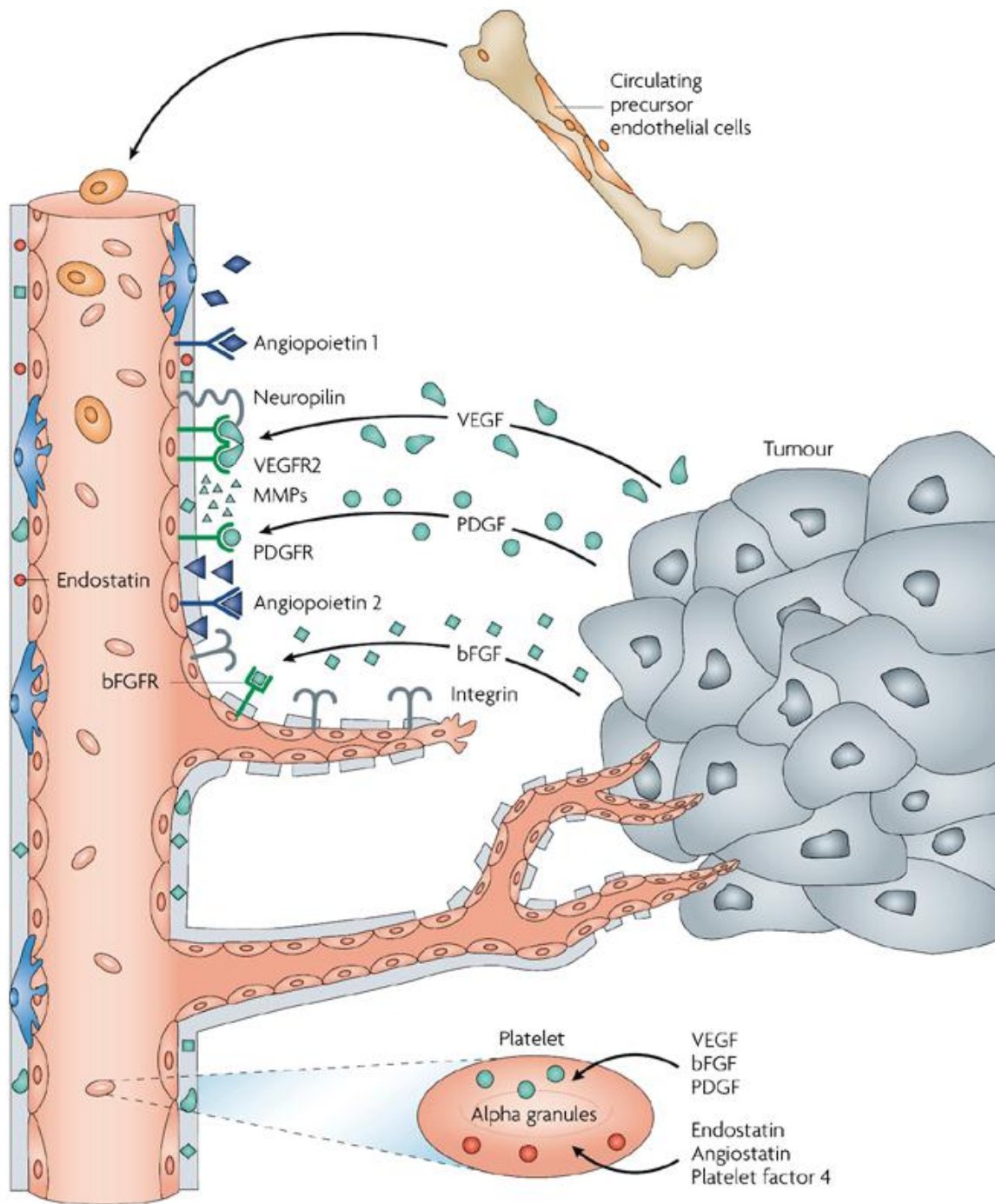


Figure 18 : L'angiogenèse tumorale et le rôle des différents facteurs au cours du processus.
 (D'après [Folkman, 2007])

2 Signalisation des récepteurs tyrosine-kinases : cas particulier du VEGFR-2

Les récepteurs de facteurs de croissance possèdent généralement un seul domaine transmembranaire. La partie intracellulaire comprend un domaine enzymatique tyrosine-kinase qui est activé par la liaison du facteur de croissance et qui catalyse le transfert de groupements phosphates sur des résidus tyrosines des protéines substrats.

Les récepteurs du VEGF partagent les mêmes mécanismes de régulation que d'autres récepteurs tyrosine-kinases de la même famille tels que le PDGFR et l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor). L'activation des récepteurs utilise des processus identiques : liaison, dimérisation des récepteurs, autophosphorylation conduisant à la formation de sites de liaison pour les acteurs de la transduction du signal. L'activation des récepteurs stimule divers processus tels que la migration, la prolifération ou encore la survie cellulaire. Le VEGFR-2 est également capable de stimuler la tubulogénèse endothéliale.

L'activité du VEGF est très finement régulée à différentes étapes [Olsson et al., 2006] incluant son expression génique, l'épissage alternatif, la régulation de la stabilité de ses ARNm et sa traduction en protéines. L'interaction ligand-récepteur, l'endocytose de ce complexe, et la signalisation intracellulaire qu'il induit sont également hautement régulées.

2.1 Activation du récepteur

Les VEGFRs sont constitués d'un domaine extracellulaire d'environ 750 acides aminés organisé en sept boucles apparentées aux immunoglobulines. La liaison du ligand se situe au niveau du deuxième domaine immunoglobuline du récepteur. Le troisième domaine immunoglobuline est quant à lui essentiel pour la spécificité de la liaison. Le domaine tyrosine-kinase se situe entre le domaine transmembranaire et la queue C-terminale intracellulaire.

L'activité du récepteur VEGFR-2 est liée à la disponibilité de ligand dans l'environnement mais également à l'hypoxie. Tout comme le VEGF, le VEGFR-2 est surexprimé en hypoxie mais le mécanisme de cette régulation n'est pas encore totalement élucidé.

Le VEGF-A est le ligand principal du VEGFR-2, mais VEGFR2 peut également lier le VEGF-C et le VEGF-D [McColl et al., 2003]. La liaison du VEGF au VEGFR-2 conduit à sa dimérisation et le complexe est ensuite stabilisé par des interactions homotypiques de basse affinité entre les domaines immunoglobulines-like des récepteurs [Yang et al., 2010]. La dimérisation du récepteur conduit à des changements conformationnels du domaine intracellulaire. Le site adénosine triphosphate (ATP) du domaine tyrosine-kinase est alors accessible. La liaison à

l'ATP permet l'auto-phosphorylation et la transphosphorylation des résidus tyrosine du complexe récepteur et des effecteurs de la signalisation en aval du récepteur et notamment les protéines comportant un domaine SH2 (Src-Homology domain-2).

2.2 Régulation de la signalisation par endocytose

La totalité du VEGFR-2 n'est pas exprimée à la surface. Environ 40% du récepteur est localisé au niveau des endosomes ce qui suggère un recyclage constitutif en dehors de toute stimulation [Jopling et al., 2011].

Dans les cellules endothéliales quiescentes, environ 30% du VEGFR-2 est localisé dans l'appareil de Golgi. Son transport vers la membrane est assuré par la syntaxine-6 (ou N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)) [Manickam et al., 2011]. En réponse au VEGF, le VEGFR-2 est alors adressé à la membrane. En l'absence de syntaxine, on observe *in vitro*, une diminution de la prolifération, de la migration et de la formation des réseaux microcapillaires.

La liaison du VEGF à son récepteur n'induit pas seulement une cascade de signalisation mais également son internalisation par endocytose [Nakayama et al., 2013]. Jusqu'à récemment, l'hypothèse prédominante était que l'activité des récepteurs tyrosine-kinase est régulée négativement par l'internalisation du récepteur et par une dégradation rapide par le protéasome et les lysosomes [Goh and Sorkin, 2013]. L'endocytose rapide et l'inactivation du VEGFR-2 sont probablement importantes pour une réponse précise et localisée au gradient de VEGF. Dans ce modèle, la régulation s'effectue par le taux de VEGF diffusible et le niveau d'expression du récepteur à la membrane. Ce schéma est néanmoins très simplifié puisqu'une cascade d'évènements survient après l'endocytose du récepteur et régule sa signalisation [Horowitz and Seerapu, 2012].

Par ailleurs, il a été montré qu'une partie du VEGF n'est pas exporté et peut agir de manière intracrine sur le VEGFR-2 intracellulaire localisé dans l'appareil de Golgi [Warren et al., 2014]. L'activation de cette voie de signalisation indépendante du VEGF extracellulaire et du VEGFR-2 membranaire échapperait aux stratégies thérapeutiques qui ciblent le VEGF exogène et le VEGFR-2.

Après sa liaison au VEGF, le VEGFR-2 est internalisé par un processus classique d'endocytose clathrine-dépendant. On observe également une possibilité d'internalisation clathrine-indépendante, impliquant la voie cavéoline-dépendante et par macropinocytose. Dans ce chapitre, je n'aborderai la signalisation que dans les conditions de stimulation classique pour laquelle la voie clathrine-dépendante est la voie majoritaire.

Deux étapes sont alors possibles : le recyclage du récepteur à la membrane plasmique, ou la voie de la dégradation par un adressage au protéasome puis aux lysosomes [Eichmann and

Simons, 2012]. Par ailleurs, une fois internalisé, le récepteur continue à envoyer des messages de signalisation qui dépendent de sa localisation dans les endosomes. Les endosomes du fait de leur volume réduit, sont un lieu propice aux interactions protéines-protéines, et à la stabilisation des complexes de signalisation ce qui permet de prolonger les messages.

Dans ce chapitre, je vais décrire les processus mis en œuvre lors de l'internalisation du VEGFR-2.

L'ensemble des mécanismes de régulation de l'internalisation du VEGFR-2 sont repris dans le schéma suivant (Figure 19).

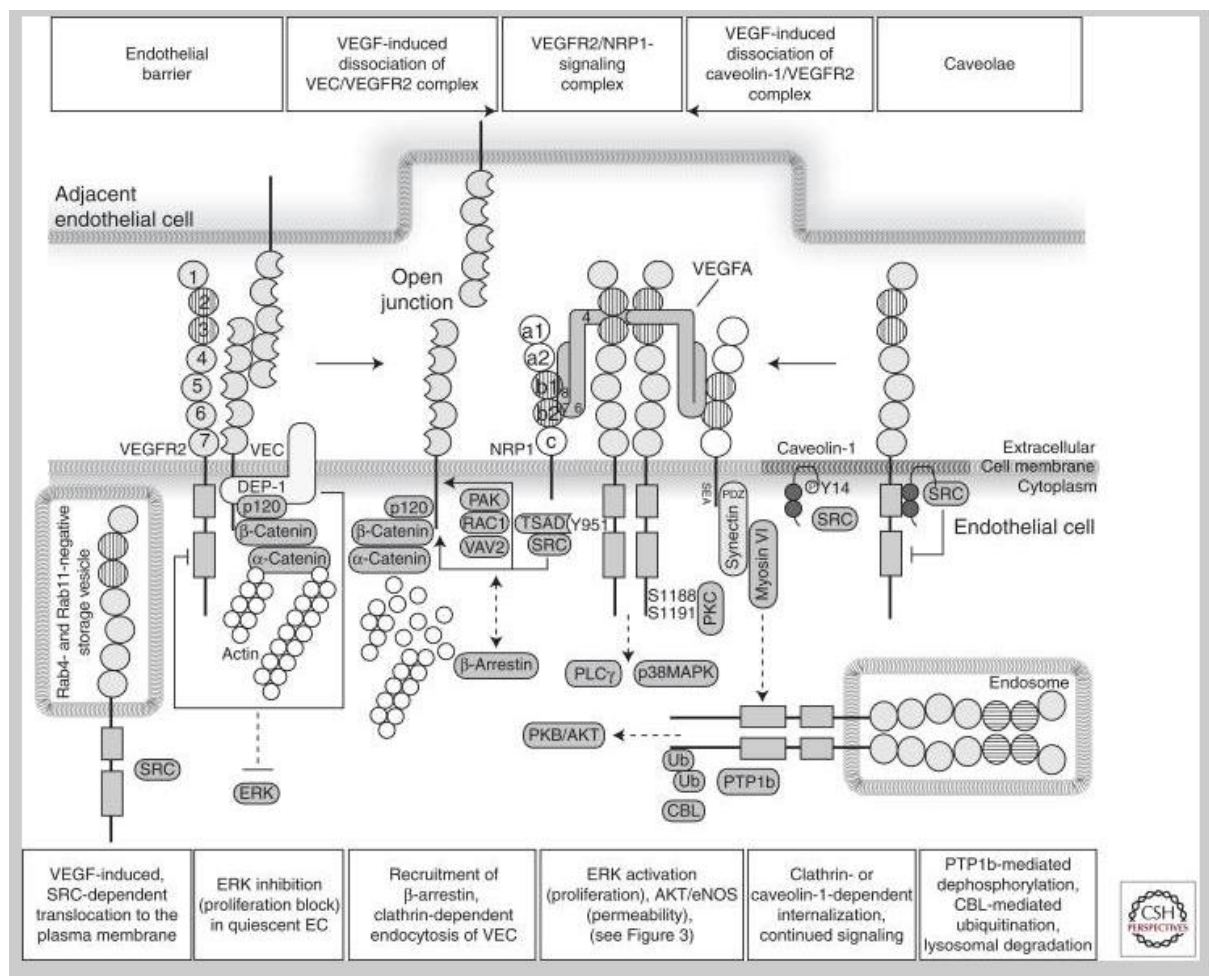


Figure 19 : Internalisation du VEGFR-2.
(D'après [Koch and Claesson-Welsh, 2012])

2.3 Rôle des protéines adaptatrices

L'adressage du récepteur vers la voie de la dégradation ou du recyclage dépend des protéines adaptatrices et des corécepteurs auxquels il va se lier (Figure 20). Les endosomes exprimant Rab7 conduisent le récepteur à sa dégradation alors que les endosomes exprimant Rab5, Rab4 et Rab11 induisent son recyclage. Les endosomes précoces (Rab5) sont capables de lier à leur surface soit les protéines adaptatrices à interaction

phosphotyrosine, avec un domaine d'homologie à la pleckstrine et un domaine leucine « zipper » (APPL1), soit l'antigène-1 des endosomes précoces (Early Endosome Antigen-1 EEA1). La présence de APPL1 ou EEA1 est exclusive car les deux protéines sont en compétition pour le même site de liaison sur les endosomes Rab5. Des études récentes montrent que EEA1 apparaîtrait tardivement sur les endosomes en remplacement de APPL1 et serait donc un marqueur de maturité des endosomes.

Protéines adaptatrices

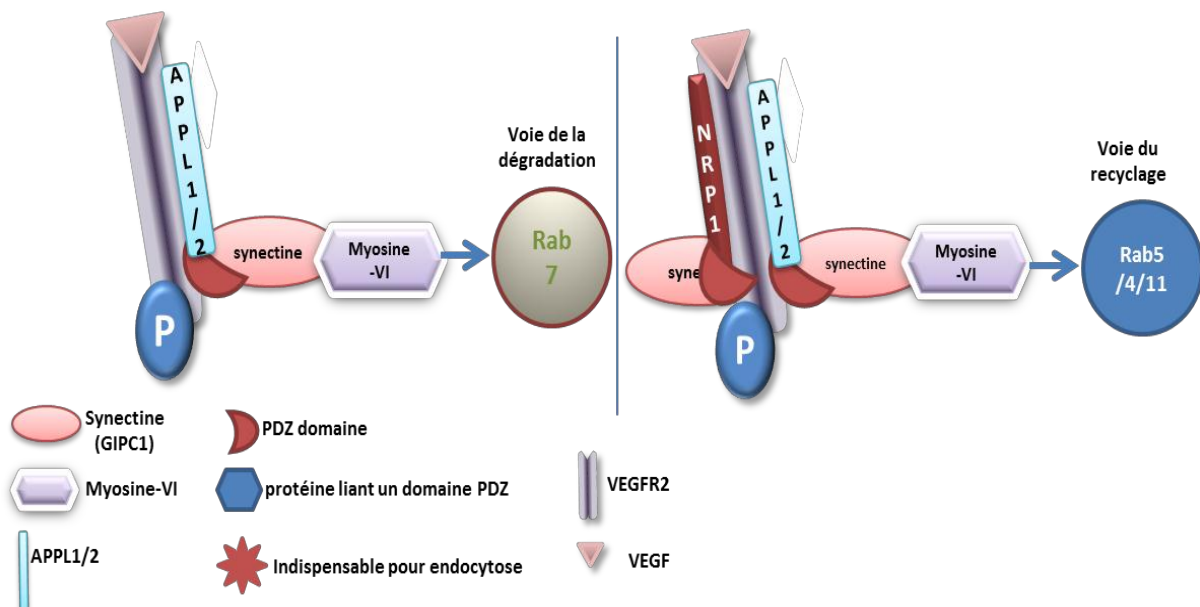


Figure 20 : Devenir du VEGFR-2 en fonction de sa liaison aux différentes protéines adaptatrices.

2.3.1 Recyclage

L'adressage du récepteur aux endosomes Rab5 [Jopling et al., 2009] est contrôlé par les protéines adaptatrices APPL1 et APPL2 [Miaczynska et al., 2004]. Ces protéines interagissent avec la protéine synectine (ou GIPC1) qui possède un domaine PDZ [Varsano et al., 2006]. La synectine se lie alors avec la myosine-VI [Naccache et al., 2006]. De plus, l'adressage dépend du ligand. Le VEGF-A165a est une isoforme capable de lier directement le VEGFR-2 et NRP1. Cette liaison aux deux récepteurs adresse le VEGFR-2 vers les endosomes Rab4, Rab5 et Rab11 permettant son recyclage à la membrane. Le domaine PDZ de NRP1 est indispensable pour cet adressage, ce qui suggère que ce processus est dépendant de la synectine [Ballmer-Hofer et al., 2011].

Des études en l'absence de synectine confortent cette hypothèse (Figure 21) : le VEGFR-2 est alors endocyté mais il reste de manière prolongée dans des endosomes précoces liant EEA1

avant d'être orienté vers les vésicules Rab4/Rab11 et recyclé. Cet adressage est dépendant de la liaison myosine-synectine [Naccache et al., 2006].

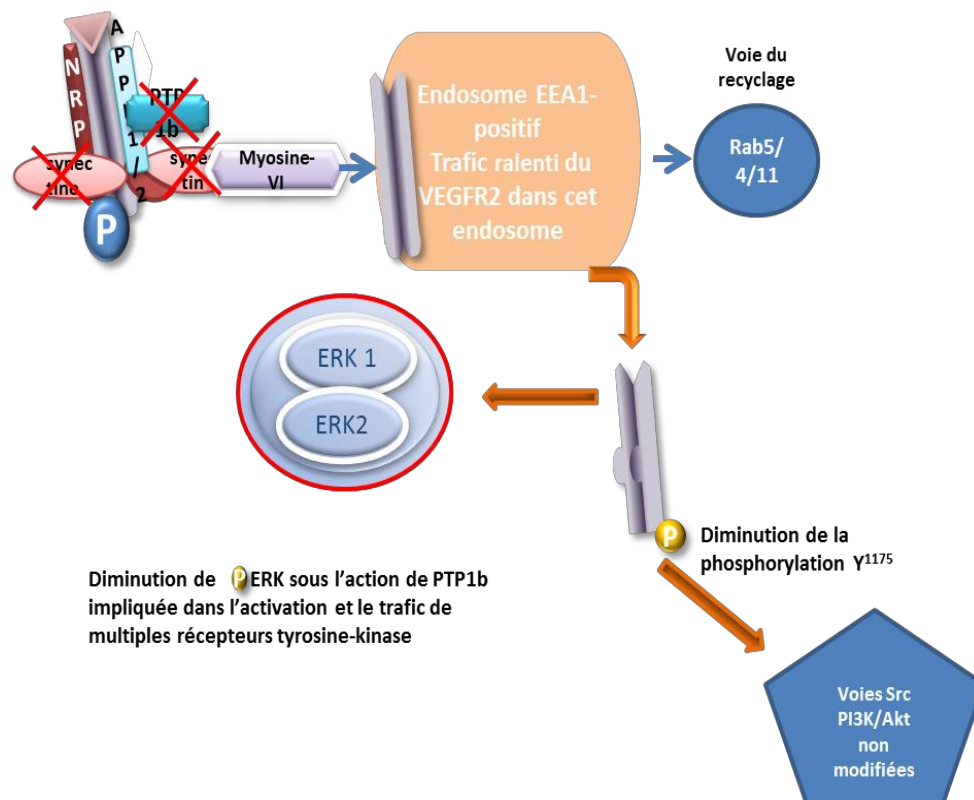


Figure 21 : Modification du recyclage du VEGFR-2 en l'absence de synectine.

En conséquence, on observe une diminution de la phosphorylation de la tyrosine 1175 du VEGFR-2. Or ce site est le plus important dans la voie de signalisation PLC γ -ERK (phospholipase C γ -ERK), dont l'activité est réduite en intensité et en durée. Les autres voies de signalisation Src et PI3K (Phosphatidylinositol type 3 Kinase) ne sont, elles, pas altérées par l'absence de synectine [Lanahan et al., 2010].

En présence de synectine, le récepteur adressé aux endosomes Rab5 est ensuite véhiculé vers les endosomes Rab4 et Rab11. A partir de ces endosomes, le récepteur retourne à la membrane par sa séquence d'adressage ou par un recyclage massif de protéines. Dans l'endosome Rab11, la tyrosine 1175 du récepteur est déphosphorylée, ce qui diminue la signalisation ERK induite par le VEGF.

La sous-population de VEGFR-2 absente de la surface membranaire est stockée dans les endosomes Rab4, et peut être rapidement dirigée à la membrane sous l'action d'un stimulus angiogène.

2.3.2 Dégradation

A contrario, le VEGFR-2 peut être conduit après son passage dans les endosomes Rab5, vers les endosomes Rab7 ou corps multivésiculaires. La signalisation intracellulaire du récepteur est alors interrompue.

L'adressage vers les différents endosomes est dépendant du ligand. En effet, l'isoforme VEGF-A165b est un ligand de VEGFR-2 mais est incapable de se lier à NRP1. L'absence de NRP1 adresse alors le VEGFR-2 vers les endosomes Rab7 induisant sa dégradation. La dégradation du récepteur fait intervenir des ubiquitines ligases [Ewan et al., 2006] et en particulier Cb1 qui polyubiquitine le VEGFR-2 et atténue le signal [Goh and Sorkin, 2013]. Par ailleurs, Cb1 régule par interaction directe l'activité de la protéine kinase C (PKC), une cible du VEGFR-2 [Singh et al., 2005]. L'internalisation et la dégradation du VEGFR-2 dépendrait ainsi de sa phosphorylation sur le domaine C terminal par la protéine kinase C.

2.3.3 Clivage protéolytique

Certaines études ont montré que le VEGFR-2 subirait des modifications par le protéasome avant sa dégradation finale dans les lysosomes [Bruns et al., 2009]. Le clivage protéolytique interviendrait immédiatement après le passage du VEGFR-2 dans les endosomes précoces. Ce clivage conduit à l'excision d'un fragment qui correspond au domaine extracellulaire et une partie du domaine intracellulaire. Le domaine intracellulaire restant pourrait être fonctionnel et activer les effecteurs des voies de signalisation. Cette hypothèse a été démontré *in vitro* avec une phosphorylation de Y1175 et l'activation des voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase ou ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase 1/2)) et AKT/PKB (Protein kinase B), mais reste à confirmer sur les fragments endogènes.

2.4 Rôles des protéines transmembranaires, corécepteurs (NRP1, EphB2, VEGFR-3...)

Une des complexités de l'étude de la régulation du VEGFR-2 réside dans le nombre important de complexes auquel il est associé (Figure 22).

Parmi ses nombreux partenaires membranaires, on retrouve VEGFR-3, NRP1, VE-Cadhérine, EphrineB2, le récepteur de la thrombospondine CD47 [Kaur et al., 2010], ou encore des intégrines. Le VEGF-A induit l'homodimérisation du VEGFR-2, mais également son hétérodimérisation avec le VEGFR-1 et le VEGFR-3, conduisant à une transphosphorylation qui déclenche les voies de signalisation.

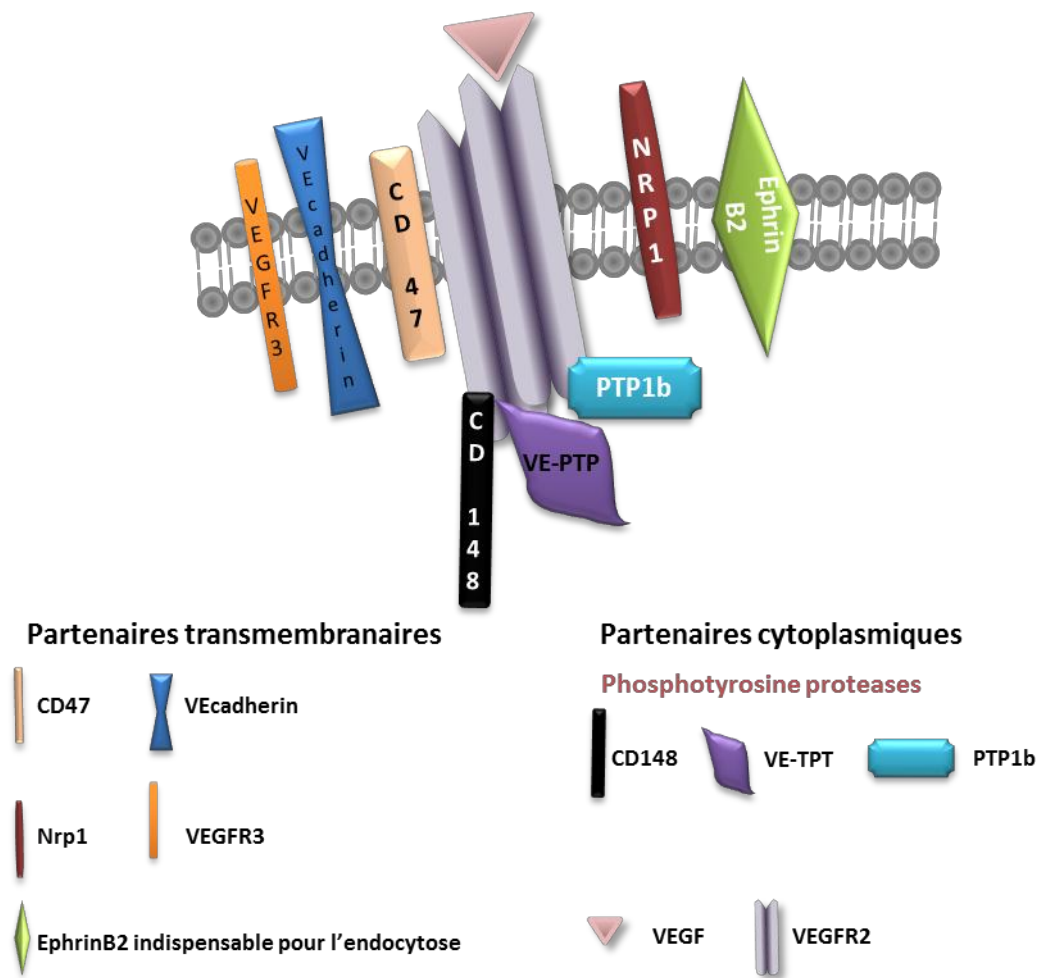


Figure 22 : Partenaires transmembranaires et cytoplasmiques du VEGFR-2.

2.4.1 L'EphrineB2 et les Héparanes sulfates

L'EphrineB2 est une protéine indispensable à l'endocytose du récepteur VEGFR2. La signalisation du VEGF est profondément altérée en son absence [Sawamiphak et al., 2010] [Wang et al., 2010]. Plus particulièrement, c'est la présence de son domaine PDZ qui est indispensable. Cette dépendance du VEGFR-2 à l'EphrineB2 est unique dans la signalisation des récepteurs tyrosine-kinase.

Les partenaires du récepteur sont nécessaires pour la qualité et la force du signal de transduction. Les héparanes sulfates augmentent la signalisation du VEGFR-2 induite par le VEGF165. Les héparanes sulfates en se liant aux facteurs de croissance et aux récepteurs augmentent la demi-vie du complexe VEGFR-VEGF [Koch et al., 2011]. De plus, la présentation en trans du VEGF au VEGFR-2 par les héparanes sulfates [Jakobsson et al., 2006] des péricytes adjacents aux cellules endothéliales augmente la durée et la force du signal [Ibrahimi et al., 2004].

2.4.2 Les Neuropilines

Les neuropilines sont des glycoprotéines transmembranaires, récepteurs des Sémaphorines impliquées dans le guidage neuronal. Elles agissent aussi comme des corécepteurs du VEGF pendant l'angiogenèse. Les voies de signalisation induites sont différentes selon le ligand. Dans le cas des Sémaphorines, l'endocytose est dépendante des radeaux lipidiques alors que lorsque le ligand est le VEGF, l'endocytose est dépendante de la clathrine [Salikhova et al., 2008]. Les neuropilines peuvent se lier au VEGFA165, mais pas au VEGFA121. Elles sont exprimées dans les neurones mais également dans les artères pour NRP1 alors que NRP2 est exprimé dans les veines et les vaisseaux lymphatiques. La liaison du VEGF à NRP1 induit une internalisation vers les endosomes Rab5/Rab4/Rab11 et diminue la dégradation [Salikhova et al., 2008] [Ballmer-Hofer et al., 2011]. Le VEGF peut se lier simultanément sur le VEGFR-2 d'une cellule endothéliale, et sur NRP1 en trans d'une autre cellule. Ceci est observé en particulier entre cellules endothéliales et cellules tumorales. Dans ce dernier cas, les tumeurs sont alors très angiogéniques [Miao et al., 2000]. NRP1 est impliqué dans la migration des cellules endothéliales car il régule la signalisation du VEGFR-2 en augmentant le signal p38-MAPK [Kawamura et al., 2008].

De ces études, il ressort qu'EphrineB2 et NRP1 pourraient avoir une activité redondante sur l'internalisation du VEGFR-2.

2.5 Rôles des partenaires cytoplasmiques

En plus de ces partenaires membranaires, le VEGFR-2 est associé avec des protéines intracellulaires et notamment des phospho-tyrosine-phosphatases (PTP) qui régulent très finement la signalisation du récepteur. Le CD148, la VE-PTP (Vascular-endothelial PTP), la DEP1 (density-enhanced phosphatase 1), la PTP du domaine d'homologie 2 de SRC (SHP2) et PTP1b sont les PTP principalement associées à la signalisation du VEGFR-2 (Figure 22). Sur des cellules endothéliales en culture, les PTPs diminuent l'endocytose stimulée par le VEGF, en déphosphorylant les tyrosines 1054 et 1059 (dans le site d'activité tyrosine-kinase) et la tyrosine 1214 responsable de l'activation de la voie Rac.

2.6 Rôles des molécules d'adhésion (VE-Cadhérine, occludine)

La VE-Cadhérine est également capable de réguler l'endocytose du VEGFR-2 [Zanetti et al., 2002] et notamment lors de la quiescence de l'endothélium [Hofer and Schweighofer, 2007]. En effet, la colocalisation de ces deux protéines, et de CD148 empêche l'internalisation du VEGFR-2 [Lampugnani et al., 2006]. CD148 déphosphoryle le récepteur diminuant l'amplitude et la durée du signal.

Le flux sanguin a une influence sur le développement vasculaire et le remodelage. Il est notamment responsable de la formation d'un complexe mécano-sensoriel composé du VEGFR-2, de PECAM-1 et de la VE-Cadhérine qui fonctionne en aval de l'activation des intégrines. Les intégrines et le VEGF sont étroitement liés dans le renouvellement et la régulation des plaques d'adhérence focale. Il a été montré que l'association du VEGFR-2 avec l'intégrine- β 1 aux adhérences focales prolonge l'activation de la voie [Chen et al., 2010], et que NRP1 est nécessaire pour la phosphorylation des kinases des plaques d'adhérence [Herzog et al., 2011]. Le VEGF induit l'activation des intégrines par la signalisation la protéine kinase B (AKT/PKB).

Par ailleurs, l'activation du VEGFR-2 conduit à la phosphorylation et à l'ubiquitination des occludines, ce qui conduit à leur internalisation dans les endosomes tardifs. Dans des conditions de quiescence vasculaire, les occludines sont constitutivement endocytées et recyclées à la membrane par les endosomes Rab13.

2.7 Signalisation intracellulaire

La signalisation induite par les facteurs de croissance a été particulièrement étudiée sur le récepteur à l'EGF (EGFR) et peut être partiellement étendue à l'ensemble des récepteurs à activité tyrosine-kinase [Mukherjee et al., 2006]. Dans le cas de l'EGFR il a été montré que sa signalisation intracellulaire perdure jusque dans les endosomes. Dans la voie de signalisation ERK, le complexe d'activation se forme lorsque le récepteur est encore à la membrane, mais il perdure dans les endosomes précoces et tardifs. On retrouve dans ces vésicules, le complexe d'activation de ERK/MEK (Extracellular signal-Regulated Kinase/Mitogen-Activated Protein kinase kinase) complet incluant, GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2), SOS (Son of Sevenless), Ras (Rat sarcoma virus) et Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma). La signalisation perdure ainsi bien après l'activation à la membrane par la liaison ligand-récepteur [Mebratu and Tesfaigzi, 2009].

2.8 Voies de signalisation impliquées

Les voies de signalisation des récepteurs tyrosines-kinases et du VEGFR-2 en particulier sont suractivées dans les tumeurs. Comprendre les mécanismes et les régulateurs de la signalisation ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques.

La dimérisation des récepteurs s'accompagne de l'activation de l'activité kinase qui induit leur autophosphorylation sur plusieurs résidus tyrosines. Ces sites phosphorylés servent alors de point d'ancrage pour plusieurs protéines adaptatrices à domaine SH2, qui vont initier l'assemblage d'autres protéines, qui agissent en cascade pour stimuler diverses voies de signalisation intracellulaires. Les trois sites majeurs de phosphorylation du récepteur VEGFR2 sont les tyrosines 951 (Tyr951) dans le domaine « insert-kinase », les tyrosines 1054

et 1059 dans le domaine kinase ainsi que les tyrosines 1175 et 1214 dans la queue C-terminale [Koch and Claesson-Welsh, 2012; Koch et al., 2011]. D'autres sites de phosphorylation ont également été identifiés (Y1223, Y1305, Y1309 et Y1319) mais leurs rôles restent inconnus à ce jour. La phosphorylation des tyrosines 1054 et 1059 (Tyr1054 et Tyr1059) est nécessaire pour obtenir une activité kinase maximale [Takahashi et al., 2001]. Les principales voies de signalisation sont les voies ERK, PI3K/AKT, Src et Rac, activées en fonction des résidus phosphorylés du VEGFR-2. Certaines voies utilisent des effecteurs communs, permettant une redondance dans l'activation des voies de signalisation (Figure 23).

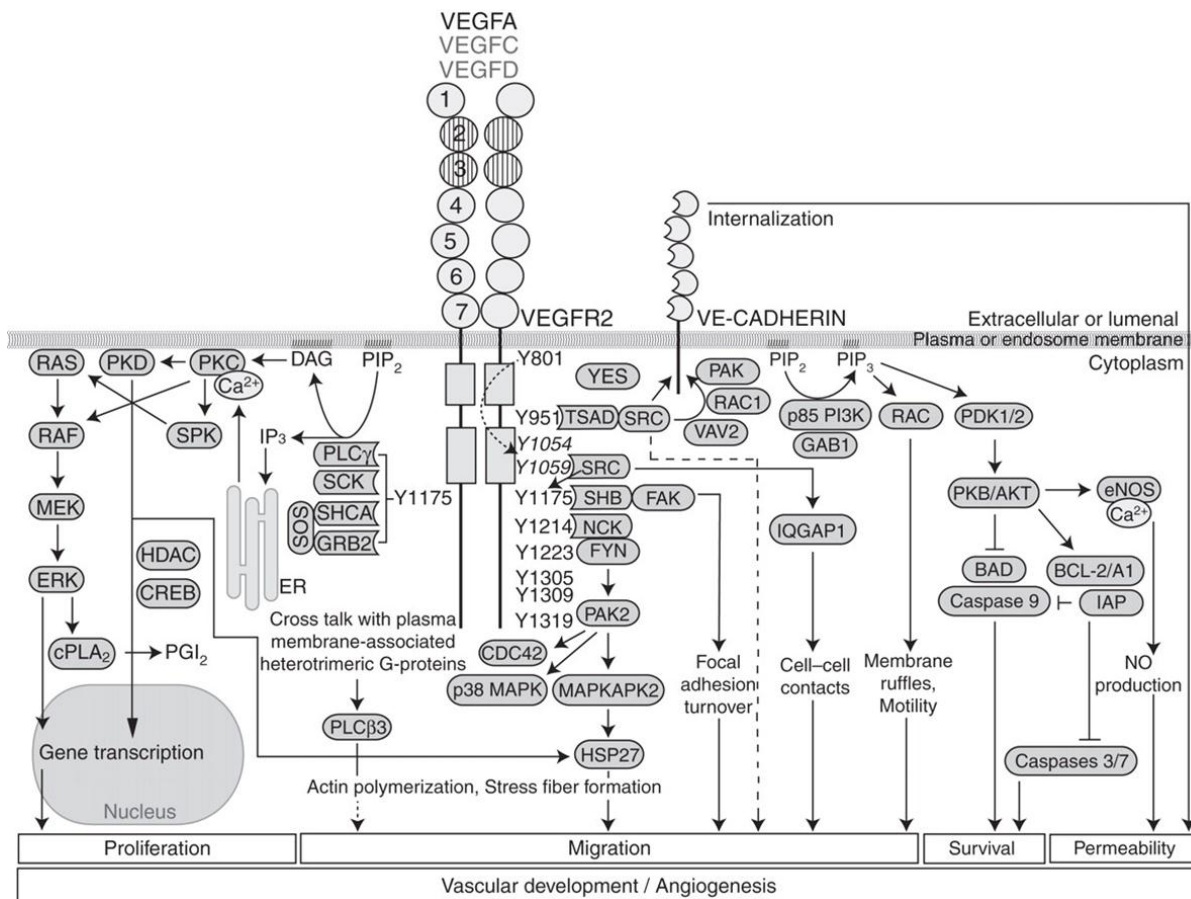


Figure 23 : Signalisation du VEGFR-2 induite par le VEGF-A165.
(D'après [Koch and Claesson-Welsh, 2012])

2.8.1 Phosphorylation sur la tyrosine 1175

La tyrosine 1175 (Tyr1175) est indispensable à l'action du VEGF sur le développement vasculaire. La mutation de ce site est létale chez la souris à un stade embryonnaire précoce (E8.5 à E9.5) [Sakurai et al., 2005]. Les embryons montrent des défauts de vascularisation similaire à ceux des souris VEGFR-2^{-/-}. La phosphorylation de ce résidu permet la liaison de plusieurs effecteurs : PLC γ et les protéines adaptatrices Shb (SH2-domain-containing

adaptator protein B) et Sck (SHC (Src homology and collagen homology)-related adaptor protein).

2.8.1.1 Voie de la kinase d'adhérence focale (FAK)

La tyrosine 1175 est un site de liaison pour la protéine adaptatrice Shb [Holmqvist et al., 2004]. Shb se lie également à FAK (Focal Adhesion Kinase) [Holmqvist et al., 2003] qui est phosphorylée par le VEGFR-2 dans des conditions *in vitro* et contribue à médier les effets du VEGF sur l'attachement et la migration cellulaire. Cette liaison Y1175-FAK-Shb induit la voie PI3K. La sérine/thréonine kinase AKT/PKB est ensuite activée en aval de PI3K et contribue à la survie cellulaire. AKT/PKB régule également la production de la NO synthase endothéliale (eNOS).

Cette voie est impliquée dans la migration de cellules endothéliales induite par le VEGF et la protéine kinase des adhérences focales FAK, ainsi que son substrat la paxilline [Parsons, 2003]. Cette voie fait également intervenir IQGAP1 (Ras GTPase-activating-like protein), qui se lie sur le récepteur phosphorylé et active Rac1 en inhibant l'activité de GTPases (guanosine triphosphate hydrolases). IQGAP1 colocalise avec le VEGFR-2 phosphorylé au niveau du front de migration des cellules endothéliales. IQGAP1 est impliquée dans la régulation des contacts intercellulaires, dans la prolifération et la migration.

2.8.1.2 Voie ERK

La voie ERK est la voie essentielle impliquée dans la prolifération cellulaire induite par le VEGF dans les cellules endothéliales. Certaines études montrent une voie de signalisation VEGFR-2 impliquant Ras alors que d'autres observent un modèle Ras indépendant.

✓ Voie classique des facteurs de croissance

Les facteurs de croissance activent la voie de signalisation ERK par une cascade de phosphorylation de protéines kinases. La liaison du récepteur à son ligand, induit son autophosphorylation et le recrutement de SHC, puis GRB2 et SOS, un GEF (guanidine exchange factor) qui active Ras. Ras activé phosphoryle ensuite Raf qui à son tour induit la phosphorylation de MEK1/2. ERK1/2 est alors le substrat de phosphorylation de MEK1/2. Certains groupes ([Meadows et al., 2001] ont établi que la prolifération induite par le VEGF passe par la voie Ras-Raf-MEK-ERK. Le site phosphorylé sur Tyr1175 de VEGFR2 pourrait se lier à SHC ou GRB2, qui recruterait à son tour SOS, [Warner et al., 2000]; [Kroll and Waltenberger, 1997] et activerait Ras et les effecteurs en aval. Mais L'interaction directe du VEGFR-2 avec GRB2 reste actuellement encore controversée. La signalisation des VEGFRs pourrait être très différente de celle des autres récepteurs tyrosine-kinase où la voie Ras-Raf-MEK-ERK est majoritaire, et impliquer la protéine kinase C.

✓ VEGFR-2 dans les cellules endothéliales

Dans le cas du VEGFR-2, il est communément admis que l'activation de ERK, responsable de la prolifération cellulaire, implique la PLC γ et le recrutement de la PKC [Gliki et al., 2001]. Dans ce processus, la PLC γ se lie sur le résidu phosphorylé Y1175. L'implication de la PLC γ dans la signalisation du VEGFR-2 est corrélée par plusieurs modèles. Chez le poisson-zèbre, la PLC γ est nécessaire au développement artériel en réponse au VEGF [Lawson et al., 2003]. De plus, la substitution par knock-in de la tyrosine 1175 du VEGFR-2 par une phénylalanine induit la mort précoce chez l'embryon de souris [Sakurai et al., 2005], et ce phénotype est identique à celui obtenu avec les souris déficientes pour le gène de la PLC γ [Liao et al., 2002]. La PLC γ phosphorylée hydrolyse le PIP₂ (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) membranaire, augmente la production de DAG (diacylglycérol) et d'IP₃ (Inositol 1,4,5 trisphosphate).

L'induction d'IP₃ augmente le niveau de calcium intracellulaire. La production de DAG et de calcium activent la PKC. Trois isoformes de la PKC (α , β , et ζ) sont impliquées dans la réponse au VEGF des cellules endothéliales [Takahashi et al., 1999], [Wellner et al., 1999] [Xia et al., 1996].

PKC active alors à son tour la cascade de signalisation activant MEK et ERK.

✓ Recrutement controversé de Ras et de Raf

Le VEGFR-2 semble donc utiliser diverses voies pour activer ERK. Le point le plus controversé apparaît être l'activation de Ras. L'interaction du VEGFR-2 avec GRB2 et SOS a été démontrée, mais l'activation en aval directe de Ras, apparaît quant à elle très discutée. Par contre, de nombreuses études ont permis d'établir un lien entre la phosphorylation du VEGFR-2, le recrutement de la PLC γ , la stimulation de PKC et enfin l'activation de Ras.

Un autre point de questionnement persiste sur la possibilité que la PKC puisse activer directement Raf par phosphorylation et ce de manière Ras-indépendante. Le groupe de Takahashi [Takahashi et al., 1999] a montré que l'activation des ERK par le VEGF dans les cellules endothéliales sinusoidales primaires est Ras-indépendante et est essentiellement médiée par la PKC.

Certains auteurs ont suggéré que la PKC puisse induire directement la phosphorylation de Raf-1 [Kolch et al., 1993]. Mais d'autres équipes [Shu et al., 2002] [Johnson et al., 2002], ont montré que la PKC active la Sphingosine Kinase (SPK) qui à son tour activerait Ras sans le recrutement de GEF (SOS) mais en diminuant l'expression de GAP (GTPase Activating Protein) (Figure 23). SPK est activée par un certain nombre de facteurs de croissance (FGF-2, PDGF, ...) et agit en convertissant la sphingosine en Sphingosine-1 phosphate (S1P), un messager secondaire impliqué dans la prolifération cellulaire.

Une des raisons évoquées pour expliquer ces différences, est la rapidité et la dynamique des processus mis en œuvre, et la difficulté de les étudier dans des modèles *in vitro* qui sont, également, des sources de variabilités.

Au cours de cette étude, j'ai été amenée à définir la voie de signalisation MAPK induite par le VEGF-A, ou le FGF-2 dans le modèle des cellules endothéliales HUVEC. Dans nos expériences, les HUVEC répondent au VEGF-A et au FGF-2 en utilisant le modèle défini par les flèches pleines dans le schéma suivant (Figure 24). La voie ERK induite par le VEGF-A suit le modèle proposé dans la littérature VEGFR-2-PLC γ -PKC-Ras-Raf-MEK-ERK. La voie du FGF-2 suit le modèle FGFR-2-GRB2-SOS-Ras-Raf-MEK-ERK.

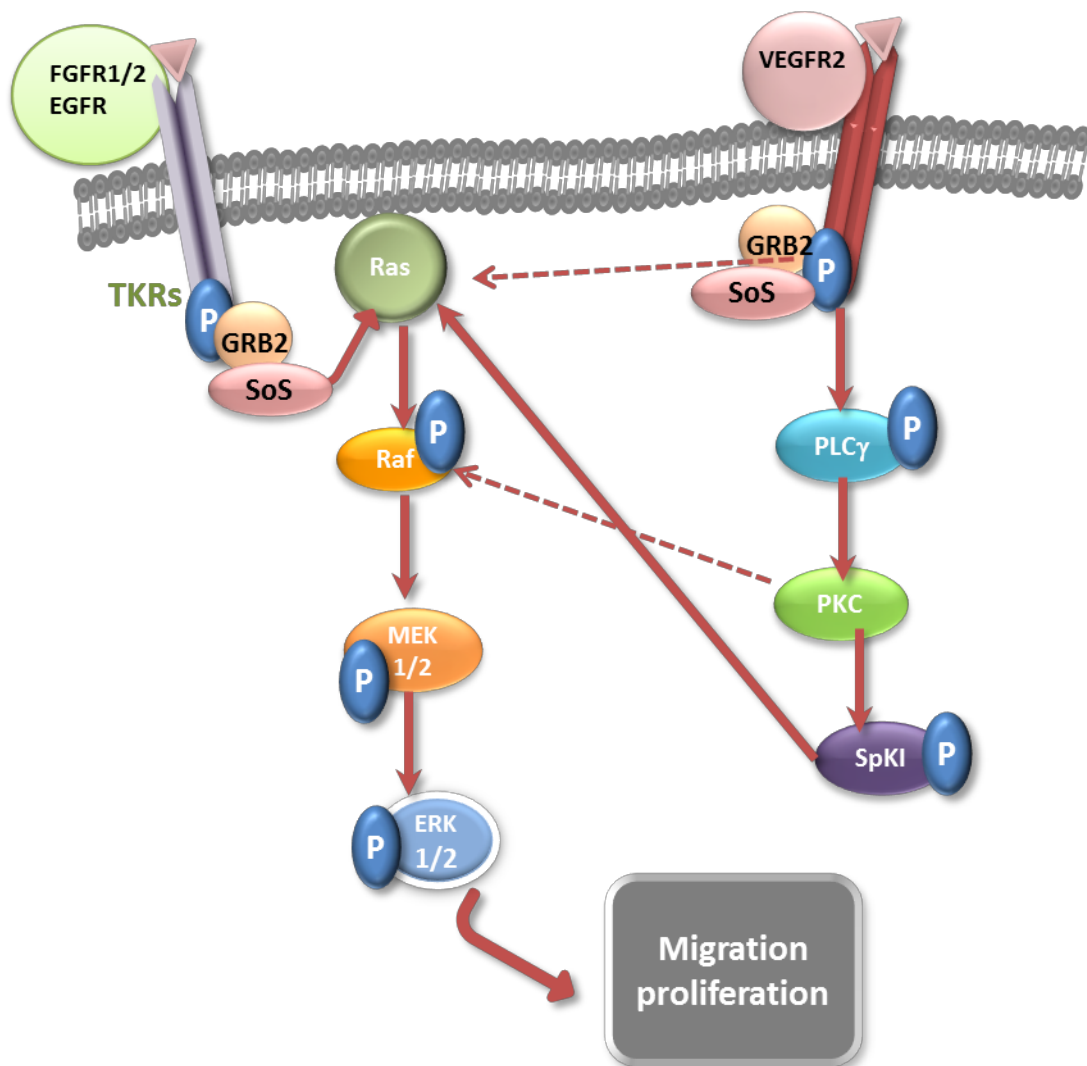


Figure 24 : Activation de la voie ERK par le FGF-2 et le VEGF-A dans les HUVEC.

2.8.1.2.1 Régulation de Ras

Ras est une famille de petites protéines à activité GTPase découverte dans les années 1980 qui contribue à la cancérogenèse. Il existe dans le génome humain, 36 gènes de Ras qui

codent pour 39 protéines. Son activité est pléiotropique puisque la majorité des protéines de cette famille régule de nombreux processus cellulaires comme la prolifération, le réarrangement du cytosquelette, adhésion, la mobilité ou encore la différenciation. La séquence Ras a été en premier identifiée sur le génome du rat [DeFeo et al., 1981] puis successivement sur celui de l'homme et de la souris. Ce proto-oncogène peut être activé par mutation en un puissant oncogène. On distingue H-Ras (pour Harvey sarcoma virus associated), K-Ras (Kristen sarcoma virus associated) et N-Ras (cloné à partir de cellules des neuroblastomes et cellules de lymphome) chez les mammifères [Taparowsky et al., 1983]. Les souris déficientes pour les différentes formes de Ras (H-Ras et N-Ras) sont viables et fertiles [Esteban et al., 2001; Umanoff et al., 1995], ce qui indique que leurs fonctions sont redondantes. Seul le KO de K-Ras est létal [Koera et al., 1997] mais H-Ras peut contrecarrer l'effet de l'inhibition de K-Ras lorsque son expression est placée sous le contrôle du promoteur de K-Ras [Potenza et al., 2005].

Des mutations de ces séquences sont retrouvées dans de nombreux cancers (côlon, poumon, vessie, pancréas, mélanome...) [Parada et al., 1982; Reddy et al., 1982]. Ras est activé par de nombreux facteurs de croissance et de cytokines mitogènes.

Ras est un effecteur de la voie ERK particulièrement étudié. Des mutations de Ras [Taparowsky et al., 1982] sont retrouvées dans de nombreux cancers (20 à 25% et jusqu'à 90% dans le cancer du pancréas). La mutation Ras^{G12V} est la modification la plus souvent rencontrée. Elle rend Ras insensible à l'action des GAP ce qui empêche l'hydrolyse du GTP en GDP et maintient Ras dans un état constitutivement actif.

Sa régulation est complexe car elle fait intervenir de nombreux activateurs et répresseurs. Ras active, lui aussi, de nombreux effecteurs. Les protéines Ras ont été décrites comme pouvant lier les nucléotides à guanine, ce qui suggère que Ras agirait de manière similaire aux protéines G hétérotrimériques [Hurley et al., 1984]. Et de la même manière c'est un transducteur de signal pour les récepteurs membranaires [Gilman, 1987].

✓ [Cycle de Ras](#)

On distingue deux formes de Ras : la forme active et la forme inactive. Dans sa forme active, Ras est associé à du GTP. Lorsque celui-ci est abondant au niveau cellulaire, il remplace le GDP fixé sur Ras sous l'action de GEF. Pour revenir à son état initial, inactif, le GTP est hydrolysé en GDP par des GAP qui possèdent une activité constitutive d'hydrolyse du GTP en GDP (Figure 25).

L'activation de Ras est liée à un changement de conformation de la structure tridimensionnelle notamment dans deux régions très dynamiques appelées Switch I et Switch II. Ces deux régions sont requises pour l'interaction à la fois avec les effecteurs en amont et en aval de Ras. La liaison du GTP modifie la conformation de Switch I permettant l'interaction avec le GTP γ -phosphate qui va à son tour modifier l'orientation de Switch II.

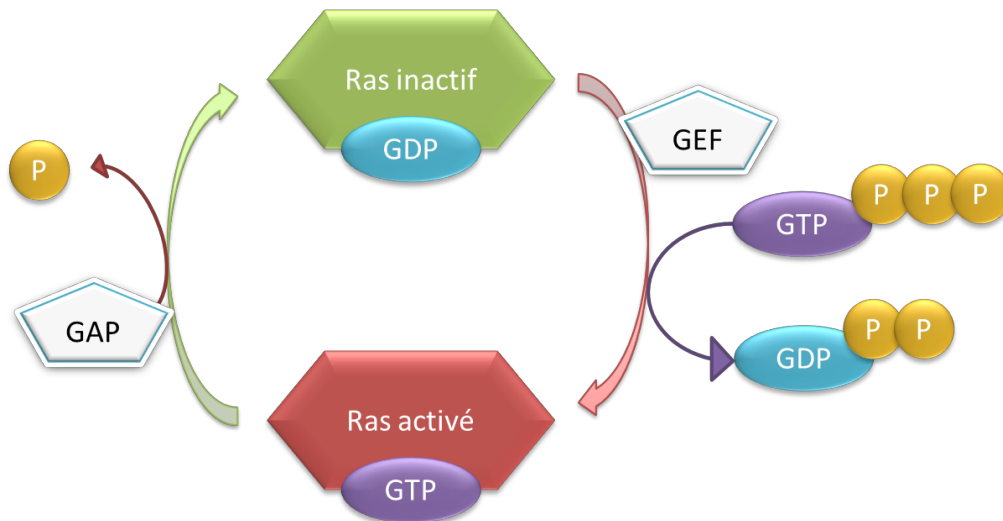


Figure 25 : Cycle d'activation de Ras.

GAP: GTPase Activating Protein; GEF: Guanine Nucleotide Exchange Factor

✓ Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles qui permettent la localisation cellulaire de Ras participent à son bon fonctionnement [Hancock et al., 1990]. Ras est une protéine membranaire qui est palmitoylée dans sa partie C-terminale (ajout d'un lipide farnesyl isoprenoïde dont le transfert est catalysé par l'enzyme farnesyl transférase [Schaber et al., 1990]). Cette association lipidique facilite l'ancrage à la membrane qui est essentiel à l'activité de Ras [Schafer et al., 1990].

✓ Les GAP et les GEF

Les GAP sont les protéines inactivatrices de Ras [Gibbs et al., 1984] [Sweet et al., 1984]. L'action inactivatrice des GAP est perdue lorsque Ras devient oncogénique [Scheffzek et al., 1997]. Les GEF vont au contraire promouvoir son activité [Shih et al., 1980] [Kamata and Feramisco, 1984]. SOS est la première protéine GEF identifiée dans des extraits cellulaires. Par la suite, il a été démontré que GRB2 [Gale et al., 1993] s'associe de manière concomitante avec les récepteurs membranaires et SOS [Egan et al., 1993; Li et al., 1993]. De nombreux partenaires de Ras (GAP et GEF) ont pu être identifiés par la présence de domaines de liaison SH2 et SH3 [West et al., 1990]. Dans les cellules endothéliales quiescentes, les GAP et notamment la p120RasGAP sont surexprimées [Westenskow et al., 2013].

✓ Les effecteurs en aval de Ras

De nombreuses voies de signalisation sont activées en aval de Ras : activation de la phospholipase A₂, phosphorylation des protéines mitochondriales, augmentation des niveaux de diacylglycérol, activation de la PKC. Ras joue donc un rôle crucial dans la prolifération cellulaire comme indiqué dans le schéma suivant et notamment dans l'activation de la voie ERK (Figure 26) [Leevers and Marshall, 1992; Moodie et al., 1993].

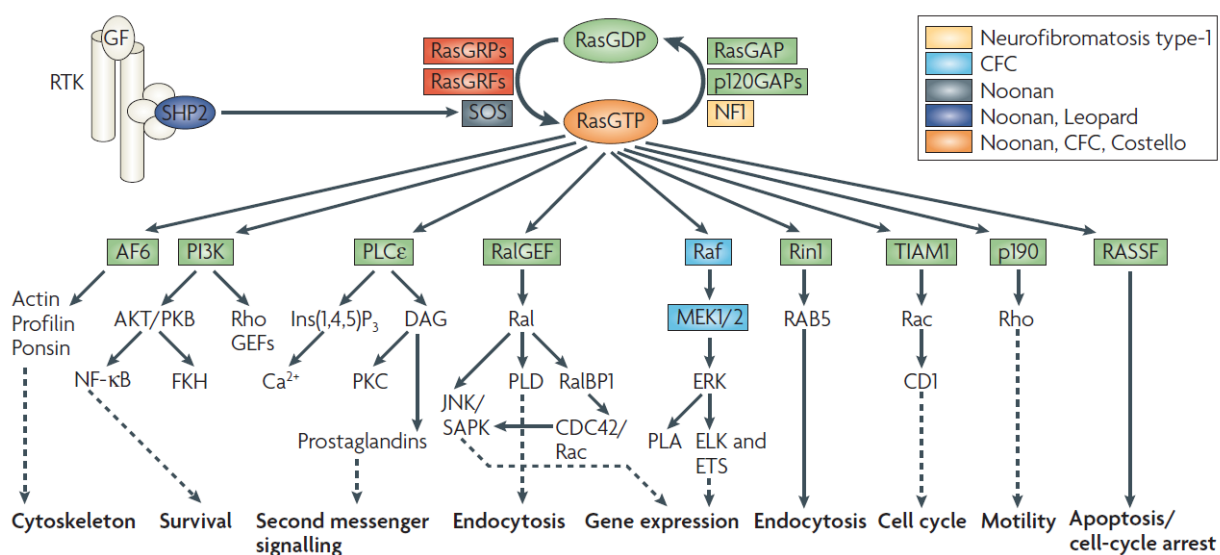


Figure 26 : Effecteurs en aval de Ras et leurs rôles dans la cellule.
(D'après [Karnoub and Weinberg, 2008])

L'un des effecteurs nous a particulièrement intéressés dans le cadre de ce travail est la Sérine/Thréonine kinase Raf [Warne et al., 1993; Zhang et al., 1993]. Son interaction avec Ras sera discutée dans le paragraphe suivant.

2.8.1.2.2 Régulation de Raf

Raf a été décrit au début des années 1980 comme étant un oncogène rétroviral [Rapp et al., 1983]. Raf est une kinase qui joue un rôle essentiel de transducteur du signal induit par les facteurs de croissance. Il a en effet été montré comme étant un activateur direct de MEK, et est donc impliqué dans la prolifération mais également dans l'apoptose cellulaire.

✓ Structure

Chez les mammifères, il existe trois formes différentes de Raf provenant de trois gènes indépendants, Raf-1 (ou c-Raf, le premier découvert), B-Raf et A-Raf. Peu de choses sont

connues sur la forme A-Raf dont la fonction reste inconnue. Au contraire, B-Raf a été bien étudié car de nombreuses mutations sont retrouvées dans les tumeurs. Les différentes isoformes partagent le même substrat de la voie ERK, MEK. Les structures des trois Raf possèdent des caractéristiques communes (Figure 27) : trois régions CR1, CR2 et CR3 hautement conservées [Morrison and Cutler, 1997].

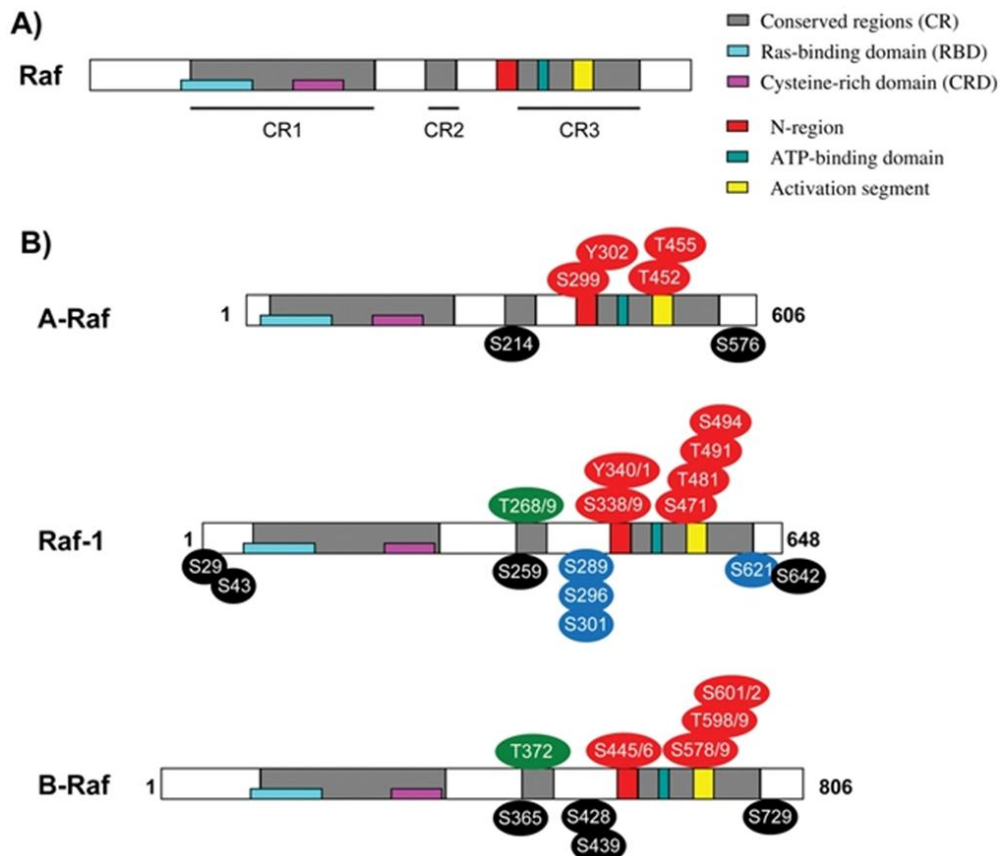


Figure 27 : Phosphorylation des différentes formes de Raf.
(D'après [Matallanas et al., 2011])

A : Structure commune entre les différentes isoformes de Raf. B : Différences de phosphorylation des isoformes.

- ✓ CR1 (conserved region 1) contient le domaine de liaison à Ras (Ras binding domain RBD) [Nassar et al., 1995] et aux phospholipides membranaires. CR1 contient également le domaine CRD (cystéine rich domain) qui est un site de liaison secondaire de Ras et un site d'interaction avec le domaine kinase d'autoinhibition de Raf [Stanton and Cooper, 1987].
- ✓ CR2 contient un important site d'inhibition de la phosphorylation de Ras permettant la régulation de Ras [Stanton and Cooper, 1987].
- ✓ CR3 est un domaine d'activité kinase, avec une séquence d'activation de la kinase.

Raf peut être divisé en deux régions fonctionnelles : d'une part, le domaine N-terminal, comprenant le site RDB essentiel pour son activation et les sites de phosphorylation

inactivateurs (sites en noir sur le schéma) ; et d'autre part, le domaine C-terminal incluant les sites de phosphorylation nécessaires pour l'activité kinase (en rouge sur le schéma (en bleu les sites pouvant être à la fois activateur et inactivateur) (Figure 27).

✓ Fonction et localisation

Comme pour Ras, les différentes formes de Raf peuvent se compenser au moins partiellement. Dans les souris déficientes en Raf-1, B-Raf est capable d'activer seul la voie de signalisation ERK [Mercer et al., 2002] mais les souris sont plus sensibles aux signaux pro-apoptotiques [Mikula et al., 2001]. Le signal transduit est également différent selon les formes : par exemple, A-Raf est un activateur plus faible de la voie ERK que B-Raf et Raf-1, et ne peut activer que MEK1, là où Raf-1 peut activer à la fois MEK1 et MEK2 [Marais et al., 1997] [Pritchard et al., 1995].

Les trois Raf ont également une localisation différente : B-Raf, Raf-1 sont exprimés dans le cerveau (pas A-Raf) ; A-Raf et Raf-1 sont fortement exprimés dans le muscle (B-Raf très faiblement). Au niveau cellulaire, on note encore des différences, puisque A-Raf et Raf-1 sont exprimés au niveau des mitochondries (cohérent avec le rôle anti-apoptotique de Raf-1), alors que B-Raf dans les neurones est exprimé dans les neurites, là où Raf-1 est périnucléaire [Morice et al., 1999].

Raf est particulièrement impliqué en pathologie dans la progression tumorale : 60% des mélanomes présentent une mutation de B-Raf. La mutation Raf^{V600E} représente à elle seule 40% des mutations de Raf dans le mélanome. Cette mutation active l'activité kinase de B-Raf en mimant la phosphorylation de la boucle d'activation.

✓ Activation par les petites GTPases

Le recrutement de Raf à la membrane par Ras est le premier événement qui va déclencher l'activation de Raf. Ras activé se lie principalement sur le domaine RGB de Raf, mais également sur le site RCD. La liaison sur les deux sites est nécessaire pour activer Raf. Toutes les isoformes de Ras lient Raf avec la même affinité mais l'activation qui en résulte ne sera pas de la même intensité (K-Ras est un plus puissant activateur que H-Ras) [Yan et al., 1998].

La famille des GTPases Rho a également été impliquée dans l'activation de Ras. Cette famille comprend Rho, Rac et Cdc42 mais l'activation est indirecte puisqu'elle fait intervenir d'autres effecteurs. Parmi eux, PAK (p21 activated-kinase) est un substrat de Cdc42 et Rac. PAK phosphoryle Raf sur la sérine 338 qui est essentielle pour le fonctionnement de Raf [Chaudhary et al., 2000]. Le rôle crucial de Rac et Cdc42 a été démontré par l'utilisation d'un mutant de Ras constitutivement actif dont le site de liaison à Raf est fonctionnel mais qui ne

peut pas activer Raf. Dans ce cas, Rac et Cdc42 peuvent restaurer l'activation de Raf [Li et al., 2001].

✓ Phosphorylations de Raf

Les phosphorylations de Raf sont essentielles pour son activité et sa régulation. Même si les processus sont communs entre les différents Raf, Raf-1 est la protéine la plus étudiée et pour laquelle les mécanismes sont les mieux connus. Dans ce chapitre, les phosphorylations décrites sont celles connues pour cette forme. Le cycle d'activation/inactivation de Raf nécessite des cascades de phosphorylation/déphosphorylation (Figure 28) [Chong et al., 2003].

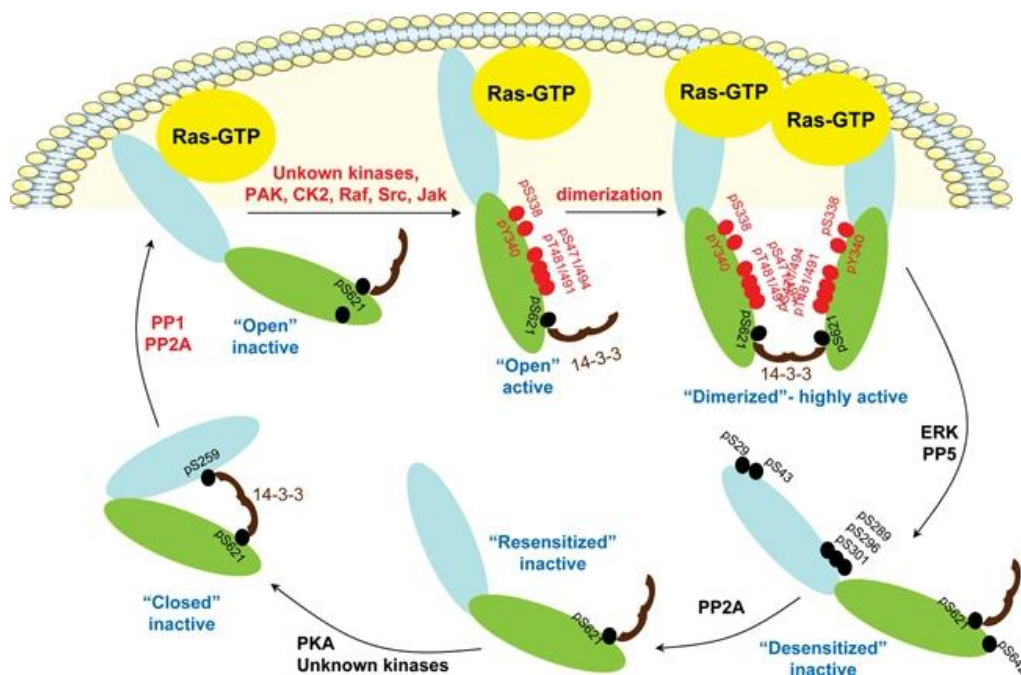


Figure 28 : Le cycle d'activation/inactivation de Raf.
(D'après [Matallanas et al., 2011])

A l'état basal, Raf est phosphorylé sur plusieurs résidus : la sérine 259 et la sérine 261 [Morrison and Cutler, 1997]. La phosphorylation de ces sites crée deux sites de liaison pour les protéines 14-3-3 qui maintiennent Raf dans son état inactif. Sur le schéma, Raf est alors fermé-inactif (« closed » inactif).

Les protéines phosphatases PP1 et PP2A sont des activateurs de Raf. En déphosphorylant S259 et S261, Raf s'ouvre, et son site de liaison à Ras, le domaine RGD, devient accessible. En même temps, Raf s'ancre à la membrane plasmique. Sur le schéma, Raf est ouvert/inactif (« open » inactif).

La liaison de Ras actif induit alors la phosphorylation de ses sites cibles : Raf devient ouvert/actif (« open » active). Raf contient quatre sites phosphorylables par Ras : les sérines 338, et 494, la tyrosine 341 et la thréonine 491. Comme évoqué précédemment, S338 est le site phosphorylable par PAK et est très important dans l'activation de la protéine [Chong et al., 2003]. Y341 est phosphorylé par Src et JAK (Janus activated kinase). Initialement la sérine 499 avait été identifiée comme étant la cible de la PKC mais ce résultat est controversé et n'a pas été reproduit, aussi ce mécanisme d'activation n'est pas encore validé.

Raf se dimérise et devient alors très fortement actif. Le site de liaison de 14-3-3 permet de stabiliser le complexe, et Raf peut alors s'autophosphoryler. Il est dimérisé-très actif (« dimerized » highly active).

Le retour à l'état inactif se produit par la déphosphorylation de la S338 sous l'action de PP5, et d'un rétrocontrôle négatif de ERK qui supprime l'activité catalytique de Raf. Raf est désensibilisé (« desensitized » inactive).

Le processus final par lequel Raf revient à son état basal n'est pas parfaitement établi. PKA et PP2 seraient la kinase et la phosphatase impliquées dans ce processus (« resensitized » inactive puis « closed » inactive).

2.8.2 Phosphorylation sur la tyrosine 1214

En dehors de la phosphorylation de la Tyr1175 qui permet d'activer la voie de signalisation décrite dans les paragraphes précédents, VEGFR-2 peut être phosphorylé sur la Tyr 1214. La phosphorylation de Tyr1214 recrute la protéine adaptatrice NCK [Lamalice et al., 2006] et la tyrosine kinase cytoplasmique Fyn. La formation du complexe NCK-Fyn induit la phosphorylation de PAK-2 puis l'activation de Cdc42 (cell division cycle 42) et p38-MAPK. L'activation séquentielle de CDC42 et p38-MAPK est responsable du remodelage de l'actine induit par le VEGF. Parallèlement, p38-MAPK induit la phosphorylation de la protéine Heat-shock 27 (HSP27), protéine chaperonne qui régule positivement le réarrangement de l'actine et la migration sous l'effet du VEGF par un mécanisme dépendant de MAPKAPK2 (MAPK-activated protein kinase-2). Dans un modèle de CAM, la voie p38-MAPK a également été impliquée dans la perméabilité vasculaire.

2.8.3 Phosphorylation sur la tyrosine 951

Un autre site de phosphorylation important est la Tyrosine 951 (Tyr951) qui est le site de fixation de la protéine TAd (T-Cell-Specific Adaptator). La signalisation Tyr951-TAd est impliquée dans la régulation de la migration des cellules endothéliales [Matsumoto et al., 2005]. Tyr951 n'est pas phosphorylable dans les cellules endothéliales quiescentes. Pendant l'angiogenèse, la liaison du VEGF au VEGFR-2 induit la phosphorylation de la tyrosine 951 qui

recrute TSAd. TSAd active alors c-Src. c-Src activé induit la phosphorylation de la VE-cadhérine sur de nombreux sites et notamment le site Y658, site de liaison de la VE-Cadhérine avec la β -caténine p120. Les deux protéines se dissocient, ce qui conduit à l'endocytose de la VE-Cadhérine et à une diminution de la perméabilité vasculaire. La mutation de Y951 ou l'inhibition de l'expression de TSAd affectent la migration et le remodelage de l'actine induits par le VEGF, mais n'affectent pas la prolifération des cellules endothéliales.

2.8.4 Phosphorylation sur les tyrosines 1054 et 1059

Ces résidus localisés dans le domaine de l'activité kinase du récepteur, sont essentiels pour son activité. Y1059 phosphorylé se lie à Src, qui à son tour peut phosphoryler Tyr1175, et certains transducteurs du signal comme IQGAP1 précédemment décrit.

2.8.5 La voie des lipides

Les sites de phosphorylation impliqués dans l'activation des médiateurs lipidiques ne sont pas encore clairement identifiés. La protéine GAB-1 (GRB2-binding Protein) contient un site de liaison à la sous-unité p85 de la PI3K. Le recrutement de GAB induit la synthèse de PIP3 (Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate) ce qui active la GTPase Rac et la migration cellulaire. La PI3K active AKT/PKB. A son tour, AKT phosphoryle BAD (Bcl (B-cell-lymphoma)-2-associated death promotor) et la caspase 9 et inhibe ainsi leur activité pro-apoptotique. AKT/PKB régule la production d'oxyde nitrique (NO) via la phosphorylation directe de la NO synthase endothéliale (eNOS).

3 Les traitements anti-angiogènes

3.1 Implications de l'angiogenèse en pathologie

Comme cela a précédemment été énoncé, à l'âge adulte, l'endothélium est quiescent. L'angiogenèse pathologique se caractérise par une réactivation angiogénique. Si l'angiogenèse physiologique est localisée et se limite dans le temps (quelques jours pour les cycles hormonaux, plusieurs mois pour la cicatrisation...), l'angiogenèse pathologique, elle, persiste pendant plusieurs années (cancer, maladies auto-immune). Dans un contexte non-pathologique, un équilibre fin entre facteurs pro-angiogènes et anti-angiogènes permet de maintenir la stabilité du réseau (Figure 29).

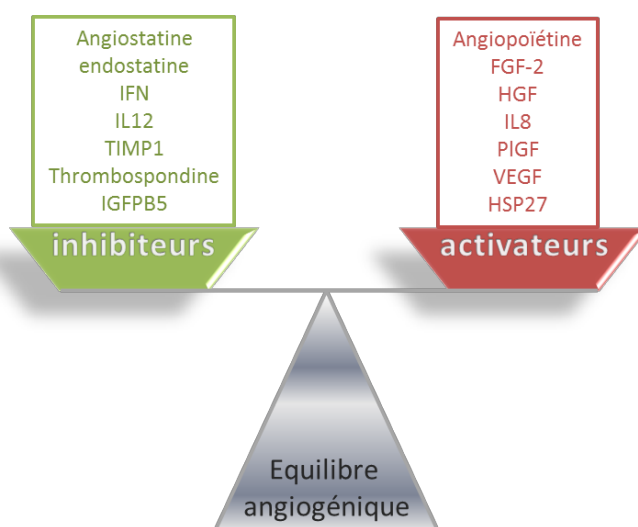


Figure 29 : Activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse.
(Adapté d'après [Folkman, 2007])

En pathologie, cet équilibre est rompu, en particulier, lorsque les conditions hypoxiques induisent une ré-expression du VEGF. Il s'agit du « switch angiogénique ». Cette angiogenèse est différente de celle observée lors du développement embryonnaire car elle est mal contrôlée. Mais elle fait appel aux mêmes facteurs et aux mêmes voies de signalisation.

Une angiogenèse excessive est impliquée dans de nombreuses pathologies notamment le cancer, les maladies oculaires et les maladies inflammatoires. Dans le Tableau 2, une liste non exhaustive de pathologies induites par une angiogénèse excessive ou dérégulée est dressée.

Organe	Pathologies (humaines ou murines)
Nombreux organes	Cancer, maladies infectieuses, pathologies auto-immunes
Vaisseaux sanguins	Malformations vasculaires, HHT, athérosclérose
Tissu adipeux	obésité
Peau	Psoriasis, dermite allergique, sarcome de Kaposi
Yeux	Rétinopathie diabétique, rétinopathie du prématuré, dégénérescence maculaire liée à l'âge.
Poumon	Asthme, hypertension pulmonaire
Intestin	Ascites, adhésion du péritoine
Système de reproduction	Endométriose, saignements utérins, kystes ovariens, hyperstimulation ovarienne
Os, articulations	Arthrite, ostéomyélite

Tableau 2 : Implication de l'angiogenèse en pathologie.

De la même manière, une vascularisation incomplète ou immature peut également être à l'origine de maladies diverses. Elle peut notamment être impliquée dans les accidents vasculaires cérébraux, l'infarctus du myocarde, les ulcères ou encore des maladies neurodégénératives. Le Tableau 3 ci-dessous montre les organes qui peuvent être affectés par un défaut d'angiogenèse et certaines des pathologies induites (liste non exhaustive, d'après [Carmeliet, 2003]).

Des stratégies pro-angiogènes ont été développées pour rétablir une vascularisation à la fois dense et fonctionnelle. En effet, il a été démontré dans la réparation tissulaire après une ischémie, les vaisseaux doivent être capables de distribuer convenablement le flux sanguin [Troidl et al., 2009].

Organe	Pathologies (humaines ou murines)
Système nerveux	Maladie d'Alzheimer, accident vasculaire cérébral, neuropathie diabétique, sclérose amyotrophique latérale
Vaisseaux sanguins	Hypertension, diabète, athérosclérose
Peau	Alopécie, télangiectasie
Rein	Néphropathie
Poumon	Détresse néonatale respiratoire, emphysème, fibrose

	pulmonaire
Gastro-intestinale	Ulcère gastrique, maladie de Crohn
Système de reproduction	Pré-éclampsie, ménorragie
Os	Ostéoporose, défaut de fracture osseuse

Tableau 3 : Implication d'une vascularisation incomplète en pathologie.

Le réseau vasculaire s'étend dans tous les organes et draine le sang à travers ses nombreux capillaires. De nombreuses pathologies sont dues au dérèglement de son fonctionnement. Ces deux tableaux montrent le rôle pléiotropique du réseau vasculaire, et souligne l'importance de développer des thérapies visant à inhiber ou stimuler l'angiogenèse. Dans le cadre de cette thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à l'inhibition de l'angiogenèse tumorale.

Les travaux du Pr. Judah Folkman [Folkman, 2003] ont en effet suggéré que l'angiogenèse est indispensable à la croissance d'une tumeur pour lui apporter oxygène et nutriments dès lors que celle-ci atteint un diamètre de 2 mm. Son observation initiale montrait que les tumeurs cancéreuses sont fortement vascularisées. L'hypothèse était donc que la vascularisation des tumeurs serait une étape fondamentale dans la progression tumorale et permettrait la dissémination métastatique. Grâce à cette découverte, le Pr. Judah Folkman a proposé de cibler l'angiogenèse pour traiter le cancer en postulant que les thérapies anti-angiogènes sont des thérapies anti-tumorales [Folkman, 1971]. Selon cette hypothèse, empêcher la formation de nouveaux-vaisseaux diminuerait la croissance tumorale et conduirait à la régression des vaisseaux tumoraux.

Le premier avantage de cette stratégie par rapport aux chimiothérapies classiques est de cibler toutes les tumeurs solides, quelle que soit l'origine des cellules tumorales. Le second avantage est que cette stratégie ne nécessite pas de pénétrer dans les tumeurs, et que les médicaments sont véhiculés par le sang eux-mêmes jusqu'aux vaisseaux tumoraux.

Les facteurs pro-angiogènes sont sécrétés par les cellules tumorales mais également par les cellules du stroma, les cellules inflammatoires et les cellules endothéliales, dérégulant ainsi l'équilibre du réseau capillaire proche de la tumeur.

3.2 Principes des traitements anti-angiogènes

Lors de l'angiogenèse pathologique les néo-vaisseaux formés sont peu fonctionnels et instables [Jain, 2005]. Ils peuvent assurer l'oxygénation des tumeurs et le transport de cellules métastatiques, mais sont très inefficaces. Les vaisseaux sont fragiles, perméables (hémorragiques) et le flux sanguin y est mal établi. Les vaisseaux tumoraux sont donc très

différents des vaisseaux physiologiques car ils sont en remodelage permanent, et leur tortuosité est élevée [Baluk et al., 2005; Bergers and Benjamin, 2003]. Le débit sanguin dans les vaisseaux tumoraux étant faible et irrégulier, les chimiothérapies sont mal distribuées dans les tumeurs [Vaupel and Hockel, 2000].

L'objectif est d'asphyxier la tumeur en détruisant les vaisseaux tumoraux anarchiques et désorganisés sans perturber le réseau vasculaire physiologique. Les stratégies anti-angiogènes proposaient une idée nouvelle consistant à cibler spécifiquement un ou des acteurs de l'angiogenèse à la place des chimiothérapies et radiothérapies qui agissent de manière non spécifique sur les cellules.

Mais avant d'obtenir la destruction des vaisseaux tumoraux, les stratégies anti-angiogènes conduisent à une situation paradoxale où on assiste dans un premier temps à une normalisation des vaisseaux [Jain, 2005] [Jain, 2001] (Figure 30) en rétablissant l'équilibre des facteurs pro- et anti-angiogènes.

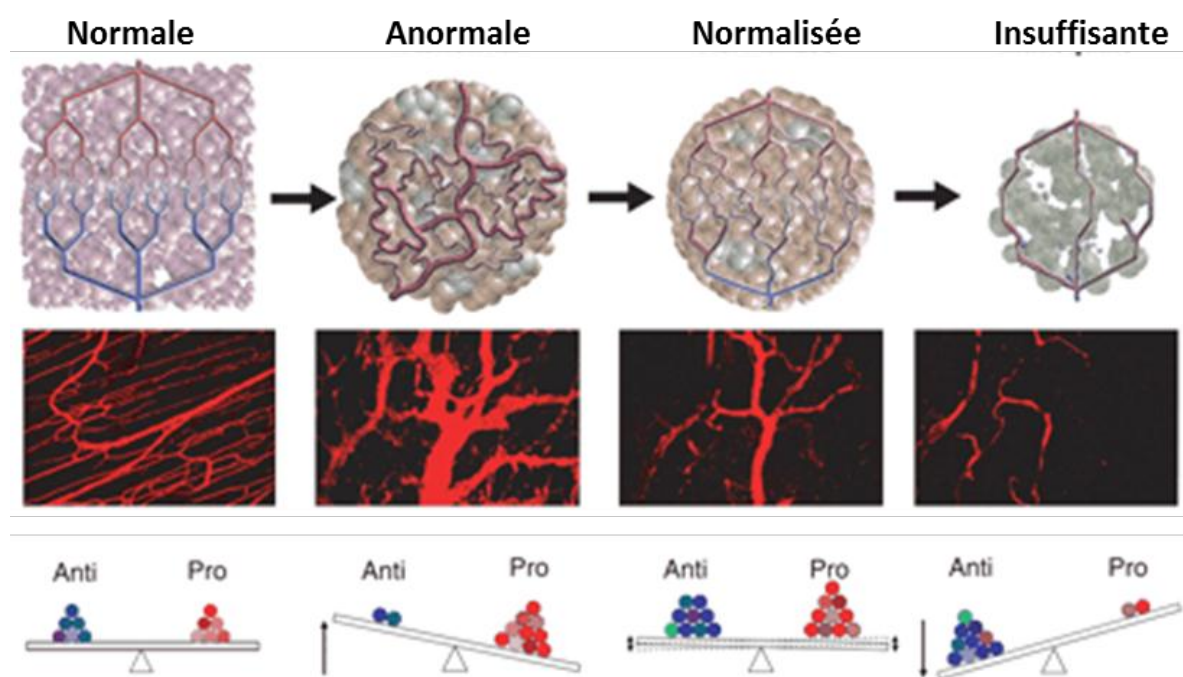


Figure 30 : Changements de vascularisation des tumeurs lors d'un traitement anti-angiogène.
(D'après [Jain, 2005])

Dans le traitement par chimiothérapie, la difficulté est d'apporter ce médicament au sein de la tumeur, car les vaisseaux sont peu fonctionnels. La normalisation des vaisseaux peut ainsi être mise à profit pour distribuer de manière plus efficace la chimiothérapie au sein des

tumeurs. Un des défis des traitements anti-angiogènes est donc de ne pas perturber la biodisponibilité des chimiothérapies mais d'agir en synergie.

De même, les traitements anti-angiogènes augmentent l'hypoxie dans les tumeurs ce qui crée un contexte moins favorable pour les radiothérapies.

Les thérapies anti-angiogènes sont dorénavant la quatrième thérapie avec la chimiothérapie, la chirurgie et la radiothérapie proposées pour le traitement des cancers. De fait, des centaines d'essais cliniques ciblant l'angiogenèse sont en cours.

3.3 Le VEGF, acteur majeur et cible de l'angiogenèse tumorale

Dès les années 1970, l'un des premiers objectifs a été d'identifier des protéines angiogènes produites par les tumeurs, les TAFs (Tumor Angiogenic Factors) qui pourraient stimuler de manière autocrine ou paracrine l'angiogenèse. Ces études ont conduit à l'identification des FGF-1 et FGF-2 puis du VEGF.

La première approche thérapeutique développée pour cibler le VEGF a été la conception d'anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF (AvastinTM ou bevacizumabTM Genentech/Roche [Ferrara et al., 2004]) ou le VEGFR-2 (SunitinibTM et SorafenibTM) [Ellis and Hicklin, 2008]. De nombreuses études ont prouvé la pertinence de cibler l'angiogenèse et le VEGF en particulier dans le traitement de certains cancers. Le bevacizumab (AvastinTM) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF-A qui empêche sa liaison aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Il agit en diminuant la vascularisation existante, il empêche la formation d'une nouvelle vasculature et normalise la vascularisation tumorale.

Dans un premier temps, il a été testé en monothérapie avec un certain succès dans le traitement des cancers rénaux à cellules claires [Yang et al., 2003a]. Un second essai clinique dans le glioblastome [Friedman et al., 2009] a démontré son utilité en monothérapie dans des tumeurs déjà traitées et échappant aux traitements. Cependant, il a rapidement été combiné avec de la chimiothérapie. En 2004, son utilisation dans le traitement du cancer colorectal métastatique a été approuvé en combinaison avec la chimiothérapie FOLFOX4 (oxiplatin, fluorouracil et leucovorin) [Giantonio et al., 2007]. Administré en monothérapie dans le glioblastome, il ne permet pas d'observer une diminution de l'activité tumorale mais sa combinaison avec la chimiothérapie augmente la réponse [Wong et al., 2011]. Cela peut s'expliquer par une normalisation des vaisseaux tumoraux qui adressent mieux les cytotoxiques à la tumeur. Le Tableau 4 ci-après résume les essais cliniques en cours avec le bevacizumab en 2012.

Essai	phase	Comparaison	Nb de patients	Médiane de survie sans progression Bz vs CTL (mois)	survie médiane Bz vs CTL (mois)
Cancer colorectal métastatique					
Study 2107	Phase III	IFL±Bz	923	10.6 vs 6.2	20.3 vs 15.6
E3200	Phase III	FOLFOX ou FOLFOX±Bz	829	7.3 vs 4.7	12.9 vs 10.2
NO16966	Phase III	XELOX ou FOLFOX±Bz	1401	9.4 vs 8.0	21.3 vs 19.9
Cancer avancé du poumon non à petites cellules					
E4599	Phase III	PC±Bz	878	6.2 vs 4.5	12.3 vs 10.3
AVAiL	Phase III	CG±Bz (15 ou 7.5 mg/kg)	1043	6.5 ou 6.7 vs 6.1	13.4 ou 13.6 vs 13.1
Cancer du sein métastatique					
E2100	Phase III	P±Bz	722	11.8 vs 5.9	26.7 vs 25.2
AVADO	Phase III	D±Bz (15 ou 7.5 mg/kg)	736	10.1 ou 9.0 vs 8.2	30.2 ou 30.8 vs 31.9
RIBBON-1	Phase III	Cape±Bz ou Tax/Anthra±Bz	1237	8.6 vs 5.7 9.2 vs 8.0	1 an 81% vs 74% 1 an 81% vs 83%
Cancer colorectal métastatique					
CALGB 90206	Phase III	IFN-α±Bz	732	8.5 vs 5.2	18.3 vs 17.4
AVOREN	Phase III	IFN-α±Bz	649	5.4 vs 10.2	23.3 vs 21.3
Cancer avancé du pancréas					
CALGB 80303	Phase III	Gem±Bz	602	3.8 vs 2.9	5.8 vs 5.9

Tableau 4 : Essais cliniques en cours avec le bevacizumab™ en 2012.

(D'après [Wu and Staton, 2012])

AVAiL : Avastin in Lung trial ; Bz : Bevacizumab ; CALGB : cancer and leukemia Group B ; Cape : Capecitabine ; CG : cisplatine+gemcitabine ; D : Docetaxol ; FOLFOX : Oxiplatin+ fluorouracil/folonic acid ; Gem : Gemcitabine ; IFL : Irinotecan+ fluorouracil+leucovorin ; P : Paclitaxel ; PC : Paclitaxel+carboplatine ; Tax/Anthra : Taxane/anthracycline, XELOX : Oxiplatin+ capecitabine.

Un autre agent ciblant le VEGF (VEGF-trap ou Aflibercept™) a également montré des résultats intéressants dans le traitement du cancer colorectal [Van Cutsem et al., 2012] et le cancer du poumon métastatique non à petites cellules [Ramlau et al., 2012]. Aflibercept™ est une protéine recombinante contenant le domaine de liaison du VEGF des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 qui agit comme un leurre pour VEGF-A, VEGF-B et PlGF. Les Etats-Unis en 2012 puis l'agence européenne du médicament en 2013 ont autorisé sa mise sur le marché.

Récemment l'Aflibercept™ en combinaison avec la chimiothérapie a montré son efficacité dans le traitement du cancer colorectal métastatique [Joulain et al., 2013] et ce même lorsque les tumeurs avaient été préalablement traitées par le Bevacizumab™ [Tabertero et al., 2014].

3.3.1 Inhibiteurs des tyrosine-kinases

Les inhibiteurs des tyrosine-kinases (TKIs) sont des petites molécules hydrophobes, qui passent la membrane plasmique et agissent de façon intracellulaire en inhibant l'activité enzymatique de diverses tyrosine-kinase (récepteurs de facteurs de croissance, protéines de signalisation intracellulaire). Le Bevacizumab permet d'améliorer la survie des patients lorsqu'il est administré en combinaison avec la chimiothérapie. Au contraire, les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKis) diminuent la taille des tumeurs en monothérapie probablement du fait qu'ils sont moins spécifiques et ont plusieurs cibles. Ces inhibiteurs multi-cibles permettent une amélioration du patient et un allongement de la survie [Motzer et al., 2009]. Les TKIs inhibent l'activité tyrosine-kinase des protéine-kinases cibles en se liant de façon compétitive au site ATP de ces enzymes. Ces kinases sont alors incapables de phosphoryler leurs substrats.

Le SunitinibTM et le SorafenibTM sont les premiers TKIs utilisés dans un grand nombre de tumeurs solides et à avoir un effet bénéfique en monothérapie.

Le Sunitinib cible les VEGFR-1, -2 et -3 mais également c-KIT et le PDGF. Il a été testé entre autre en clinique (phase III) dans le cancer du rein métastatique [Motzer et al., 2007]. En combinaison avec la chimiothérapie dans le cancer du poumon non à petites cellules, des bénéfices cliniques pour le patient sont observés mais il ne prolonge pas sa survie [Paz-Ares et al., 2012].

Le SorafenibTM inhibe à la fois le VEGFR-2, la kinase B-Raf, un effecteur de la voie MAP-kinase, ainsi que c-Kit, PDGFR et Flt-3.

L'inhibition simultanée de plusieurs cibles paraît une stratégie prometteuse. De nombreux essais en phase III sont en cours comme c'est le cas pour le NintedanibTM, un inhibiteur du VEGFR, FGFR, et PDGFR dans le cancer de l'ovaire et le cancer du poumon non à petites cellules.

Actuellement, le PazopanibTM administré à 800 mg/jour a montré des résultats encourageants en phase III dans le traitement du rein métastatique en augmentant de manière significative, la survie sans progression tumorale [Sternberg et al., 2010]. Il s'agit d'un anti-angiogène ciblant les VEGFRs-1, -2 et-3, PDGFR et c-Kit.

Le Tableau 5 recense, plusieurs anticorps et TKIs anti-angiogènes, leurs cibles et leurs applications thérapeutiques.

Spectre d'action	Molécule	Cible	Type de cancer	Dose	Phase de développement
Cible unique	bevacizumab	VEGF-A	Cancer colorectal métastatique, Cancer du poumon non à petites cellules et non épidermoïde Cancer du rein métastatique	5-15 mg/kg	Approuvé US/UE
	Cetuximab (erbitux)	EGFR	Cancer tête-cou, Cancer colorectal		Approuvé US/UE
	Panitumumab (vectibix)	EGFR	Cancer métastatique colorectal		Approuvé US/UE
	Trastuzumab (herceptin)	HER-2	Cancer du sein et gastrique surexprimant HER-2		Approuvé US/UE
Multi-cibles	Aflibercept	VEGF-A -B, PIGF	Cancer colorectal métastatique	4 mg/kg	Approuvé US/UE
	Axitinib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer rénal avancé		Approuvé US/UE
	cediranib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer métastatique colorectal Glioblastome récurrent, Cancer de l'ovaire, Cancer du poumon		Phase III
	indetanib	VEGFR, PDGFR, FGFR	Cancer de l'ovaire, Cancer du poumon non à petites cellules		Phase III
	pazopanib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer rénal avancé, sarcome avancé des tissus mous	800 mg/jour	Approuvé US/UE
	sorafenib	VEGFR-2-3, Raf, PDGFR, KIT	Carcinome hépatique, Cancer rénal avancé	50 mg/jour	Approuvé US/UE
	sunitinib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT, FLT3, CSF-1R, RET	Cancer rénal avancé, Cancer du pancréas avancé ou métastatique, Tumeurs endocrines, Tumeurs gastrointestinales	37.5-50 mg/jour	Approuvé US/UE
	vandetanib	VEGFR-2, EGFR, KIT, RET	Cancer médullaire de la thyroïde		Approuvé US/UE
	vatalanib	VEGFR-1-2-3, PDGFR, KIT	Cancer colorectal		Phase III

Tableau 5 : Agents anti-angiogènes, leurs cibles, leurs applications cliniques et le stade des essais.

(D'après [Limaverde-Sousa et al., 2013])

3.3.2 Les VDAs (Vascular Disrupting Agents)

Les VDAs sont des molécules conçues pour détruire la vascularisation tumorale et induire la nécrose de la tumeur, contrairement aux anti-angiogènes dont la stratégie consiste à empêcher la néo-vascularisation [Thorpe, 2004]. Les VDAs ciblent les vaisseaux

matures, établis dans la tumeur et ne sont donc pas stricto sensu des anti-angiogènes qui, eux ciblent les néo-vaisseaux bourgeonnants. On distingue deux types de VDAs : les petites molécules et les molécules utilisant la liaison à une cible vasculaire tumorale (Figure 31).

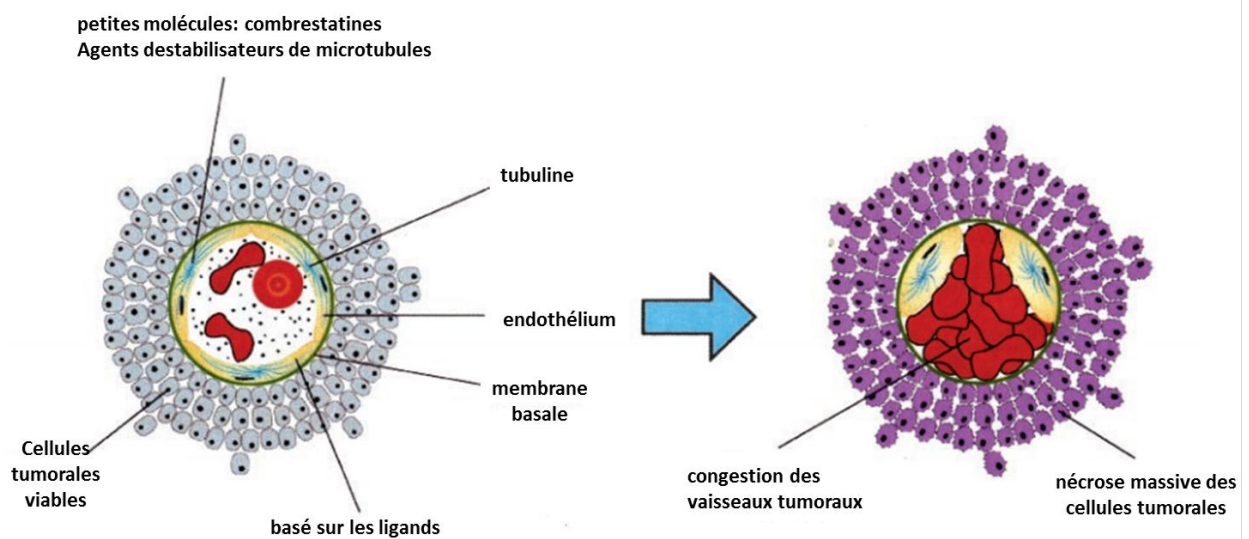


Figure 31 : Mécanismes d'action des VDAs et leurs cibles.
(D'après [Thorpe, 2004])

✓ Les petites molécules

Les petites molécules agissent de manière non sélective sur les cellules tumorales et l'endothélium mais tirent profit de la différence phénotypique entre les cellules endothéliales quiescentes et les cellules endothéliales en prolifération dans les tumeurs, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'importance du cytosquelette de tubuline pour maintenir la forme des cellules. Les petites molécules incluent les composés destabilisateurs des microtubules, qui sont des agents anti-mitotiques [Nihei et al., 1999], et les combretastines (structure proche de la colchicine) qui inhibent la polymérisation des microtubules [Tozer et al., 1999].

✓ Les VDAs basés sur la liaison des ligands

Ces composés utilisent des anticorps, des peptides, ou des facteurs de croissance qui se lient spécifiquement sur les vaisseaux tumoraux et qui sont couplés chimiquement avec des agents cytotoxiques ou pro-coagulants. Le vaisseau ciblé est soit détruit, soit bouché par coagulation, ce qui induit la nécrose du tissu adjacent.

Cependant, la nécrose de la tumeur est incomplète et, on observe, en périphérie, des cellules tumorales viables qui peuvent à nouveau proliférer. Les VDAs agissent efficacement sur les vaisseaux intra-tumoraux, alors que les anti-angiogènes détruisent

préférentiellement les vaisseaux périphériques. La combinaison des deux thérapies permet d’agir sur la totalité de la vascularisation tumorale. Actuellement, des essais cliniques sont en cours dans le traitement de cancers par les VDAs (Tableau 6), en combinaison avec la chimiothérapie ou le Bevacizumab.

Molécule	Combinaison	Type de cancer	analyse	Résultats en mois	Phase de développement
Vadimezan	Carboplatin/ Paclitaxel	Cancer du poumon non à petites cellules (1 ^{ère} ligne)	Survie globale	Arrêt sans bénéfice	Phase III
	docetaxel	idem (2 ^{ème} ligne)			
Fosbretabulin	Carboplatin/ Paclitaxel	Cancer du poumon non à petites cellules	survie sans progression	8.6 vs 7.9	Phase II Phase II/III en cours
	Bevacizumab Carboplatin/ Paclitaxel	Anaplasie de la thyroïde	Survie globale	5.2 vs 4.0	résultats intermédiaires
Plinabulin	Docetaxel	Cancer du poumon non à petites cellules	Survie globale	Réponse 22% vs 5%	Phase II en cours résultats intermédiaires
AVE8062	Cisplatine	Sarcomes	survie sans progression	Non rapporté	Phase II/III
Verubulin		Glioblastome	Survie sans progression	22 jours	Phase II

Tableau 6 : Essais cliniques en cours avec les VDAs en 2013.
(D’après [Mita et al., 2013])

3.3.3 Autres cibles thérapeutiques

Des anticorps monoclonaux dirigés contre le récepteur de l’EGF (epidermal growth factor) inhibent l’angiogenèse. Cela s’explique par des voies de signalisation communes entre le VEGF et l’EGF [Petit et al., 1997]. Les facteurs comme le FGF-2, les éphrines, l’Hepatocyte Growth Factor (HGF) et les angiopoïétines importants dans l’angiogenèse sont des cibles thérapeutiques pour lesquelles des molécules antagonistes ont été développées ou sont en cours de développement.

Le PlGF est un facteur angiogène uniquement dans des conditions pathologiques [Hattori et al., 2002]. C’est une cible thérapeutique émergente puisque la diminution de son expression réduit la croissance tumorale sans effets secondaires notables [Fischer et al., 2007]. En parallèle, son administration induit la revascularisation de tissus ischémiques [Luttun et al., 2002].

D’autres voies de signalisation sont également la cible des recherches thérapeutiques. Comme nous l’avons vu précédemment la cascade de signalisation Notch/Dll4 est très

importante pour la densité vasculaire. Diminuer l'activité de la voie Notch/Dll4 augmente la densité vasculaire mais le réseau formé est très peu fonctionnel, extrêmement ramifié et mal perfusé ce qui induit une diminution de la progression tumorale [Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006]. A contrario, la surexpression de Dll4 et donc la stimulation de la voie Notch induit une diminution du nombre de vaisseaux mais aussi une normalisation des vaisseaux tumoraux (recrutement de cellules péricytaires, augmentation de la perfusion) et donc une augmentation de la croissance tumorale [Li et al., 2007].

Certaines stratégies consistent à cibler (i) l'activation de Notch en inhibant la γ -secrétase responsable du clivage et donc de l'activation de Notch, (ii) ou encore de produire des anticorps monoclonaux dirigés contre le site de clivage de Notch après sa liaison avec Dll4. L'objectif est d'obtenir une thérapie ciblée qui présenterait moins d'effets secondaires que les précédentes et de proposer des alternatives thérapeutiques.

L'implication des progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse dans la promotion de la vascularisation tumorale ou dans le « switch angiogénique » est toujours débattue et serait dépendante du contexte [Fang and Salven, 2011]. C'est également une cible thérapeutique potentielle.

Un autre facteur pouvant influencer la réponse au traitement est le mode d'administration. La méthode conventionnelle en chimiothérapie consiste à administrer la dose maximale tolérable suivie d'une période de pause thérapeutique. L'équipe de Folkman en 2000 proposait que les doses délivrées au patient soient en faible quantité mais sur des périodes longues afin d'empêcher la tumeur de se multiplier pendant le laps de temps sans traitement et de développer des résistances [Browder et al., 2000]. Cette stratégie de chimiothérapie métronomique connaît un certain succès dans le traitement des cancers du sein métastatique [Montagna et al., 2012]. En effet, comme précédemment évoqué, les cellules endothéliales sont génétiquement stables et ne doivent pas en théorie acquérir de résistance aux thérapies anti-angiogènes. Cependant, dans les tumeurs, certaines cellules endothéliales et les cellules tumorales prolifèrent de manière excessive. Ces cellules endothéliales seraient donc sensibles à la chimiothérapie qui ciblerait de fait également les vaisseaux tumoraux.

3.4 Limitations des traitements anti-angiogènes actuels et nécessité d'alternatives

Avec une décennie de recul sur les traitements anti-angiogènes, plusieurs constatations sont à prendre en considération.

- L'utilisation d'anti-angiogènes ne prive pas uniquement la tumeur de nutriments, mais contribue à la normalisation de son réseau vasculaire. Avec pour conséquence, une possible meilleure distribution des chimiothérapies dans les tumeurs.

- Dans le traitement du cancer du sein, une situation plus constatée a été observée. L'Avastin™, a été dans un premier temps proposé en thérapeutique, puis retiré en novembre 2011 aux Etats-Unis et en 2012 en Belgique. En effet, l'augmentation de l'espérance de vie de 5.5 mois annoncée n'a pas été retrouvée dans les études à plus grande échelle. Les effets secondaires observés (hémorragies) ont été jugés trop importants par rapport aux bénéfices pour maintenir l'anticorps sur le marché pour ce type de tumeurs. Cet exemple montre les limitations des traitements anti-angiogènes et la nécessité d'évaluer le rapport bénéfice/risque.
- Les thérapies anti-angiogènes peuvent avoir des effets secondaires importants amenant parfois à l'arrêt du traitement. Des patients atteints de cancers du poumon ont souffert d'hémorragies dues probablement à la destruction de vaisseaux suite à un traitement à l'Avastin™. L'augmentation du risque de thrombose est accru [Ferrara and Kerbel, 2005] car le traitement anti-angiogène augmente la sécrétion de facteurs pro-coagulants [Ma et al., 2005] et diminue le niveau de NO (inhibiteur de l'agrégation des plaquettes) [Yang et al., 1996]. Parmi les autres effets indésirables, on note également l'hypertension, la protéinurie, des perforations gastro-intestinales, la fatigue...
- Les patients souffrant d'une même pathologie présentent des réponses différentes aux traitements anti-angiogènes. Un des défis de cette stratégie thérapeutique est d'identifier des biomarqueurs qui pourraient à un stade très précoce du traitement prédire les patients qui seront « bons » ou « mauvais » répondeurs. Actuellement, les effets secondaires (hypertension, protéinurie) sont des signes de réponses aux anti-angiogènes mais ne sont pas totalement fiables [Rini, 2008].
- L'imagerie vasculaire ne permet pas non plus d'observer de manière certaine l'efficacité des anti-angiogènes. Les vaisseaux tumoraux sont tortueux, dilatés et peu fonctionnels, ces caractéristiques sont identifiables par IRM (Imagerie par résonance Magnétique) ou tomographie par émission de positons. Dans le gliome, à un stade d'études cliniques et précliniques, la mesure de la densité microvasculaire tumorale permet d'évaluer la réponse aux anti-angiogènes [Batchelor et al., 2007]. Cependant, à ce jour, il n'existe pas de marqueur biologique [Lee et al., 2006], clinique ou radiologique prédictif de la réponse au traitement, des études ayant montré des résultats discordants.
- Si les traitements anti-angiogènes ont permis de prolonger la survie de nombreux patients pendant plusieurs mois, en revanche, ils ne permettent pas d'obtenir une guérison [Kerbel, 2008]. Un des problèmes majeurs rencontrés dans les thérapies anti-angiogènes est l'acquisition de résistance aux traitements [Bergers and Hanahan, 2008]. Les principaux mécanismes de résistance aux traitements sont

décrits dans la Figure 32. Une des hypothèses avancées est qu’une fois la tumeur devenue métastatique, la vascularisation de la tumeur n’est plus dépendante du VEGF, et que cibler le VEGF seul n’est pas suffisant pour induire une régression tumorale. De manière surprenante, il a été observé en clinique que les patients dont la tumeur échappait au traitement au Bevacuzimab™, peuvent recevoir et répondre pendant un certain temps à un traitement avec des TKIs. Lors de l’échappement à ce nouveau traitement, un nouveau traitement à base de Bevacuzimab™ est de nouveau efficace (Pr. Jean-Luc Descotes, CHU de Grenoble, communication personnelle).

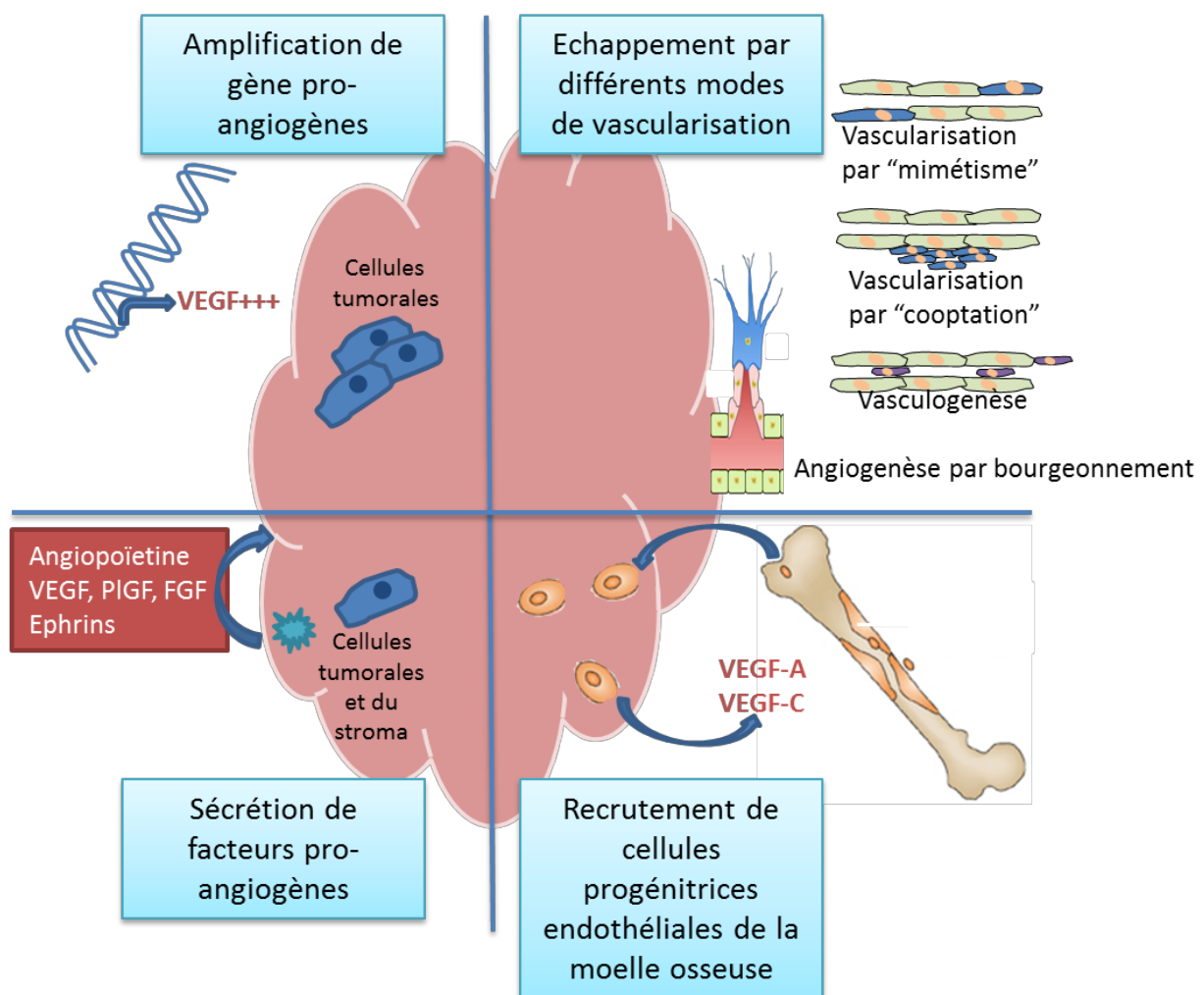


Figure 32 : Mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogènes.
(Adapté d’après [Loges et al., 2010])

- Dans la plupart des cancers, après quelques mois, la progression tumorale reprend. Du fait de l’absence de biomarqueurs d’efficacité, le suivi de la réponse et la détection de ce moment d’échappement est difficile à évaluer. Les mécanismes

d'activation de l'angiogenèse étant redondants, les cellules tumorales échappent à l'inhibition d'une voie en compensant par la surexpression d'une autre voie de signalisation. Par exemple, on observe un échappement au Bevacizumab par la surexpression du facteur Bv8 (Bombina variagata peptide 8) [Shojaei et al., 2008] [Qu et al., 2012]. Ce phénomène est retrouvé dans la voie Raf, où l'inhibition de B-Raf, favorise l'émergence de cellules utilisant la voie c-Raf, voire A-Raf. Le traitement peut conduire à sélectionner un clone cellulaire au potentiel angiogénique plus élevé ou qui peut utiliser un autre mécanisme d'activation [Yu et al., 2002]. Les alternatives thérapeutiques à cette résistance sont présentées sur la Figure 33.

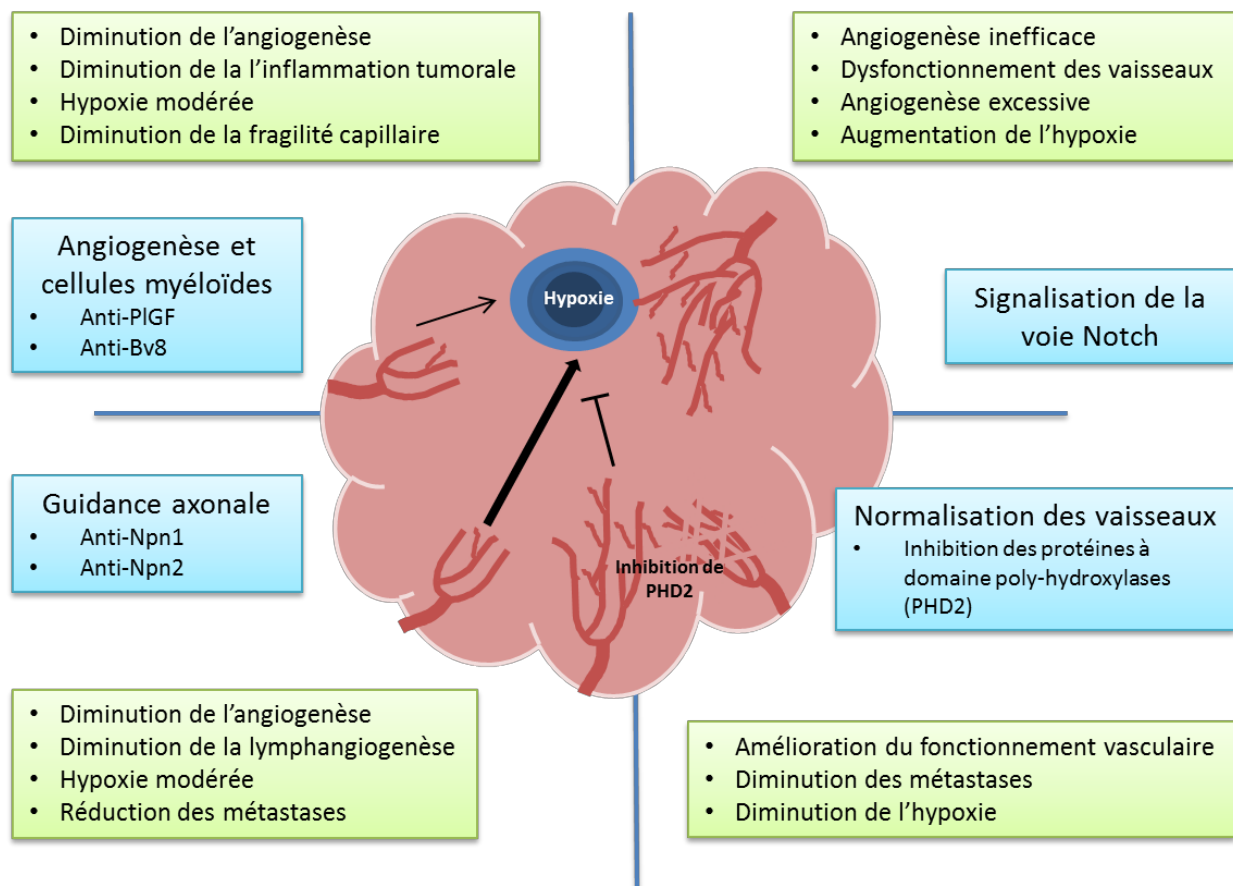


Figure 33 : Nouvelles cibles potentielles.
(Adapté d'après [Loges et al., 2010])

- Enfin, le coût élevé des traitements est un aspect non négligeable. Leur efficacité et le bénéfice pour les patients dans leur qualité de vie et leur chance de survie sont des facteurs importants dans le développement de ces stratégies.

Par ailleurs, plusieurs études [Paez-Ribes et al., 2009] [Ebos et al., 2009] ont montré que le traitement de certains cancers avec des thérapies anti-angiogènes permet de diminuer le volume tumoral de la tumeur primaire mais amplifierait l'activité métastatique et l'invasion

chez la souris [Loges et al., 2009]. Ces effets controversés ne sont pas confirmés par des études cliniques mais permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'échappement tumoral.

De tous ces résultats, il ressort la nécessité d'apporter de nouveaux traitements anti-angiogènes qui pourraient être administrés en seconde ou troisième ligne, lorsque la tumeur échappe au traitement initial.

4 Les modèles d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*

Les modèles d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* sont utilisés pour tester l'efficacité des composés anti (ou pro) angiogènes. De nombreux tests sont actuellement disponibles, chacun faisant appel à une ou plusieurs des caractéristiques des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse : la prolifération, la migration, la formation de nouveaux capillaires et le recrutement de péricytes [Vailhe et al., 2001].

4.1 Tests d'angiogenèse *in vitro*

Dans ce chapitre, seuls les modèles que j'ai utilisé pour notre étude seront décrits (Figure 34).

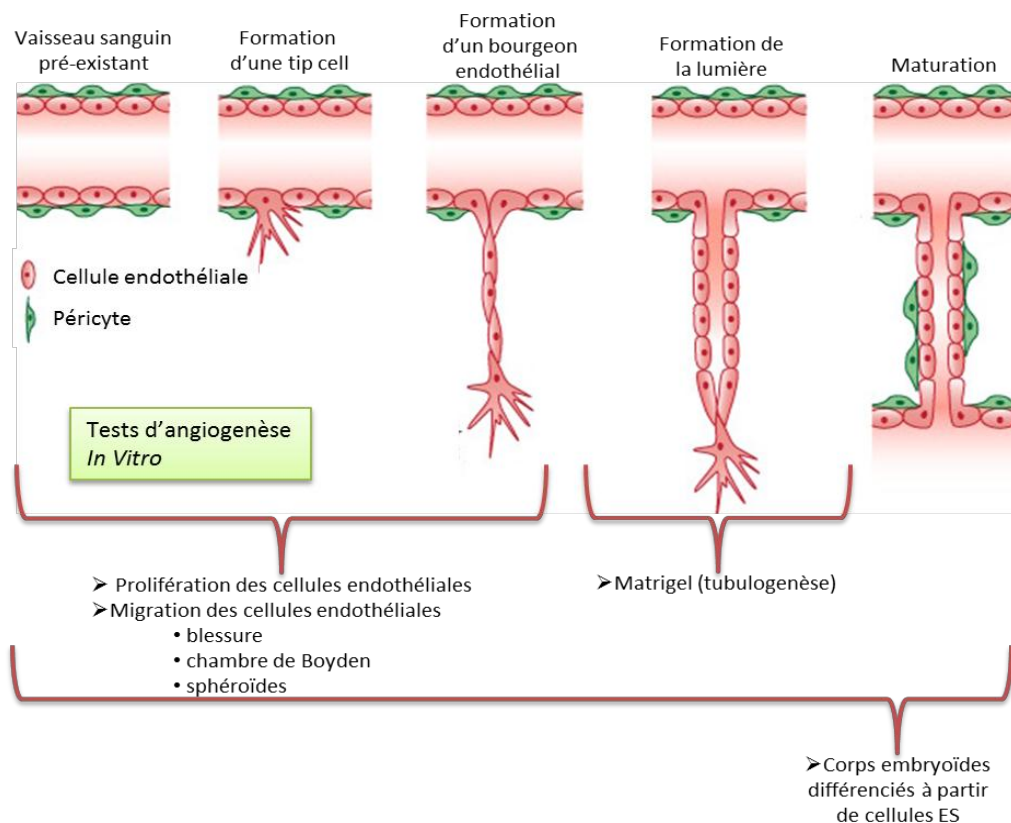


Figure 34 : Etapes de l'angiogenèse étudiées par les tests d'angiogenèse *in vitro*.
(modèles d'angiogenèse d'après [Francavilla et al., 2009])

Les cellules endothéliales primaires représentent le modèle expérimental de prédilection pour les modèles d'angiogenèse *in vitro*. Les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) [Jaffe et al., 1973] et les HMVECD (Human dermal Microvascular Endothelial

Cells) sont les deux types cellulaires les plus fréquemment utilisées. Mais un des problèmes rencontrés avec ces cultures est la variabilité des réponses en fonction du donneur et leur rapide dédifférenciation après quelques doublings de population. La lignée HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell 1) a été générée par Ades et al [Ades et al., 1992]. Il s'agit de cellules endothéliales microvasculaires du derme humain immortalisées par un plasmide pBR322 contenant la région codante pour l'antigène grand T de SV40 (Virus Simien 40). Les cellules HMEC-1 gardent les caractéristiques des cellules endothéliales notamment au niveau de l'expression de marqueurs endothéliaux tels que PECAM-1, VE-Cadhérine, ALK1, endogline, le facteur de Von Willebrandt et le récepteur VEGFR-2. Elles conservent également leur capacité à former un réseau de type vasculaire sur du matrigel. Contrairement aux cellules endothéliales primaires qui deviennent sénescents après quelques passages, les cellules HMEC-1 sont décrites pour conserver leur phénotype endothélial après de nombreux passages. Cependant, il s'agit de cellules transformées et immortalisées, certains tests faisant appel à la migration et la prolifération de ces cellules doivent de ce fait être confirmés dans d'autres modèles expérimentaux.

Pour étudier l'angiogenèse, différents tests ont été développés. Le modèle d'angiogenèse parfait regrouperait les différentes étapes de l'angiogenèse depuis le décollement des cellules de leur membrane basale jusqu'à la formation de capillaires reliés en un réseau fonctionnel. Chaque test *in vitro* est réducteur mais permet d'étudier un ou plusieurs des paramètres du processus complet. Devant la complexité du processus étudié, c'est la combinaison de plusieurs tests qui permet de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse.

4.1.1 Blessure d'une monocouche endothéliale

Le test de blessure d'une monocouche endothéliale fait appel aux propriétés migratoires, et, s'il est fait en présence de sérum, aux propriétés prolifératives des cellules endothéliales. C'est un test simple, peu coûteux et qui permet d'étudier la migration directionnelle des cellules après une blessure. Une monocouche confluyente de cellules est blessée, si bien que les cellules sur le front de la blessure migrent jusqu'à rétablir un contact cellule-cellule [Lampugnani, 1999]. La prise de photographies ou de vidéos de la blessure à intervalles réguliers permet de visualiser et quantifier le taux de fermeture (Figure 35). Les techniques de « cell tracking » permettent de suivre le déplacement en temps réel des cellules et donnent des informations sur leur direction et leur vitesse de déplacement. Cette technique, rapide, a été largement adoptée pour étudier en première approche, l'effet de molécules sur l'angiogenèse.

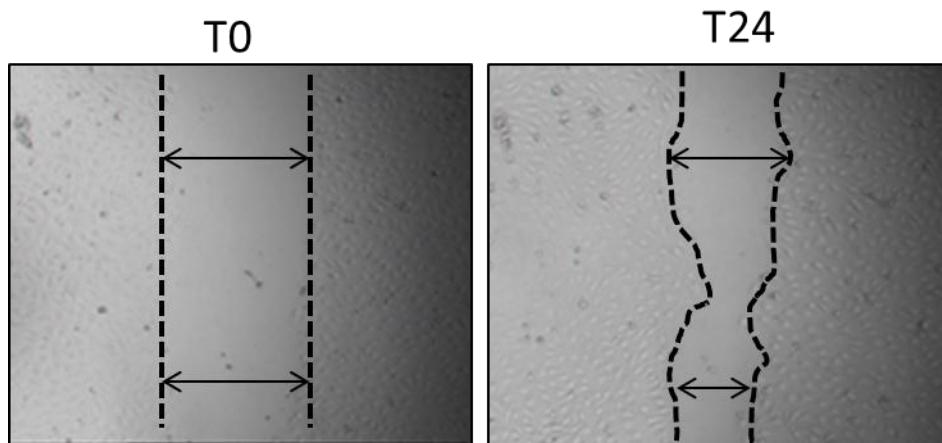


Figure 35 : Photographies d'un test de blessure sur des cellules HMVECd.
(Données personnelles)

4.1.2 Test de migration en chambre de Boyden

Ce test repose sur la migration par chimiotactisme des cellules [Boyden, 1962]. Elles sont ensemencées dans une chambre sur une membrane semi-perméable dont la porosité peut varier de 3 à 12 μm . La chambre est posée dans un puits qui contient du milieu avec le chimioattractant. Les cellules migrent à travers la membrane [Alessandri et al., 1983] et sont ensuite détectées par différentes méthodes (fluorescence, coloration au violet crystal, etc). La capacité migratoire des cellules peut ainsi être mesurée et quantifiée (Figure 36). De manière à simuler le microenvironnement physiologique, les filtres peuvent être recouverts avec une protéine de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou le collagène.

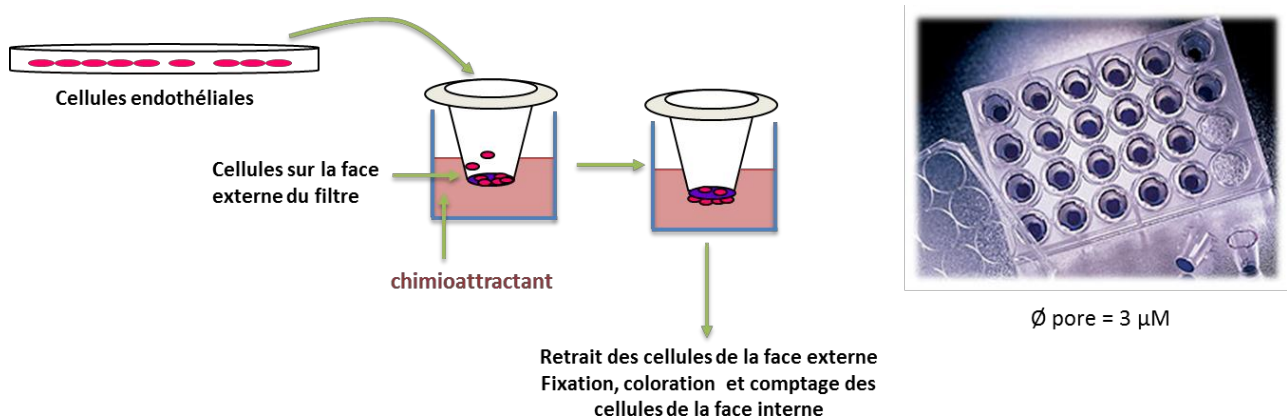


Figure 36 : Principe du test de migration en chambre de Boyden

Les principaux avantages de ce test sont sa reproductibilité, sa très grande sensibilité à de faibles différences de gradients, et sa rapidité ce qui permet d'exclure la prolifération

cellulaire. Ce test a pu être adapté aux plaques multi-puits rendant possible le test en parallèle d'un plus grand nombre de composés.

4.1.3 Tubulogenèse sur matrice

Les tests font appel aux propriétés de différenciation des cellules endothéliales. Elles ont en effet la capacité de former *in vitro* des réseaux tubulaires tridimensionnels, ce qui correspond à des étapes plus tardives de l'angiogenèse. Ce phénomène peut être accru en plaçant les cellules sur une matrice de collagène ou de fibrine [Wong et al., 2003] fixée sur le plastique de culture et qui vont lui conférer des propriétés proches de celle de la matrice extracellulaire [Lawley and Kubota, 1989] [Kanzawa et al., 1993]. Ces matrices stimulent l'attachement des cellules, mais également leur migration, et leur organisation en tubules. Les différents types de collagène n'induisent pas la même différenciation. Les cellules endothéliales prolifèrent sur les collagènes I et III, mais forment un réseau par réarrangement et non par prolifération sur les collagènes IV et V. Le Matrigel® qui peut remplacer avantageusement le collagène ou la fibrine est une matrice principalement composée de laminine préparée à partir de cellules tumorales de sarcome Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Les cellulesensemencées sur la matrice, adhèrent rapidement et s'organisent en quelques heures (de 4h à 24h, voire 1h sur Matrigel®) en un réseau de cordons cellulaires (Figure 37). Des études en microscopie électronique ont montré l'existence d'une lumière et de jonctions endothéliales serrées dans ces tubules [Auerbach et al., 2003]. Selon la nature des cellules et la matrice, la question de savoir si ces cordons sont capables de former une lumière vasculaire persiste [Connolly et al., 2002] [Bikfalvi et al., 1991].

La réponse aux facteurs pro ou anti-angiogènes dans ce système est quantifiée selon quatre critères : la longueur des tubules formés et leur nombre, la surface occupée par le réseau et le nombre de points de jonction entre ces tubules.



Figure 37 : HUVEC formant un réseau de tubules sur Matrigel® (photo à 24h).
(Donnée personnelle)

Des tests de tubulogénèse par coculture de cellules endothéliales avec des cellules stromales comme des fibroblastes ou des cellules de muscle lisse ont été développés pour reproduire un environnement plus physiologique et les interactions intercellulaires [Bishop et al., 1999]. Cependant, des interactions non spécifiques entre les fibroblastes et les cellules endothéliales rendent l'interprétation des résultats délicate.

4.1.4 Bourgeoisement tridimensionnel de sphéroïdes endothéliaux

Les tests en trois dimensions ont pour objectif de positionner les cellules endothéliales dans un contexte environnemental plus proche de la physiologie afin de préserver leurs fonctions et leurs phénotypes. La réalisation d'un modèle de sphéroïdes de cellules endothéliales permet l'étude de la différenciation des cellules et des fonctions liées à cette différenciation. Les cellules sontensemencées dans un mélange de méthylcellulose et de milieu. Dans ces conditions, les cellules s'agrègent spontanément et forment des corps sphériques en 24 à 48h. Une cellule endothéliale en suspension entre en apoptose, mais le contact cellule-cellule engendré par cette formation leur permet de répondre à des facteurs de survie. Au sein du sphéroïde, les cellules établissent une monocouche polarisée recouvrant l'extérieur alors que l'intérieur est composé de cellules désorganisées [Korff and Augustin, 1998]. A 24h, les marqueurs endothéliaux CD31 et CD34 (qui disparaît spontanément en culture en monocouche) sont exprimés sur les cellules du sphéroïde. Le corps ainsi formé est dans un état de quiescence où les cellules du cœur survivent grâce aux facteurs de croissance du milieu (VEGF-A) alors que les cellules de surface maintiennent la structure par des jonctions serrées. A ce stade, les sphéroïdes peuvent être transférés dans du collagène de type I. Ils bourgeonnent alors spontanément [Korff and Augustin, 1998], par migration et infiltration des cellules dans la matrice (Figure 38).

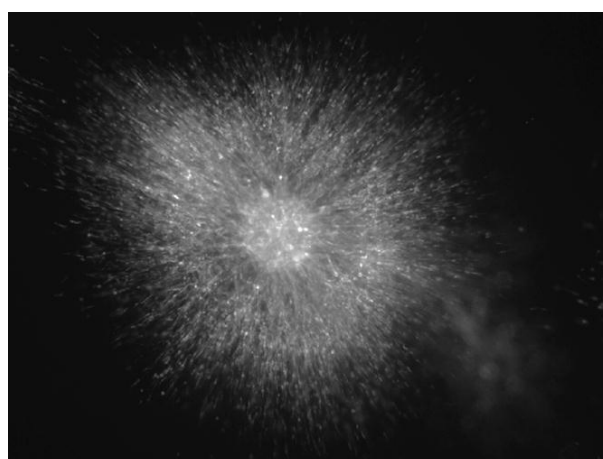


Figure 38 : Bourgeoisement d'un sphéroïde endothélial en gel de collagène.
(Cellules HMEC-GFP, donnée personnelle)

Le même type de bourgeoisement endothélial est observé dans des expériences *ex vivo* d'anneaux d'aorte de rat inclus dans des matrices [Nicosia and Ottinetti, 1990]. Dans ce test

qui permet d'observer les remodelages morphogéniques, il est néanmoins difficile de distinguer la fonction des différents types cellulaires présents dans l'explant (fibroblastes, péricytes et cellules endothéliales). L'avantage des sphéroïdes issus de cellules endothéliales est de pouvoir analyser finement la différenciation de ces cellules uniquement.

Dans cette configuration tridimensionnelle, l'ajout de FGF-2 potentialise ce processus. Il agit de manière synergique avec le VEGF-A [Xue and Greisler, 2002]. Ce modèle est particulièrement bien adapté pour étudier la biodisponibilité des facteurs angiogènes. En effet, l'inclusion en gel crée un gradient de diffusion entre le milieu, l'oxygène [Griffith and George, 2009], les facteurs de croissance et les cellules du sphéroïde, ce qui rappelle les conditions physiologiques d'angiogenèse.

Ce test très complet permet d'étudier les premières étapes de l'angiogenèse (prolifération, migration, invasion, formation de tubules), le rôle des cytokines [Stratman et al., 2011], des molécules d'adhésion ou encore des métalloprotéases [Ghajar et al., 2006], [Collen et al., 2003].

4.1.5 Bourgeonnement endothélial après différenciation de cellules souches embryonnaires murines

Les cellules souches embryonnaires murines (ESC) peuvent se différencier dans certaines conditions de culture vers le lignage endothélial [Vittet et al., 1996] et récapitulent toutes les étapes du processus angiogénique incluant le recrutement des cellules péricytaires. Les cellules souches sont facilement modifiables génétiquement ce qui permet d'étudier la fonction d'un gène dans le développement vasculaire [Magnusson et al., 2005], [Wang et al., 2004]. Un test d'angiogenèse en gel de collagène à partir de cellules ESC [Feraud et al., 2001] a été établi dans lequel les cellules sontensemencées dans un premier temps en méthylcellulose. Après 11 jours, des corps embryoïdes sont formés et transférés en matrice de collagène de type I. Sous l'induction de facteurs de croissance (FGF-2 et VEGF-A), les cellules ESC s'engagent dans le lignage endothélial et les corps embryoïdes bourgeonnent à partir de J13. Un réseau complexe et extrêmement ramifié s'établit alors. Le caractère endothélial de certains de ces bourgeons est confirmé par un immunomarquage endothélial spécifique comme CD31 par exemple (Figure 39). Des marquages du protéoglycane NG2 attestent du recrutement de cellules péricytaires sur les bourgeons endothéliaux [Ozerdem et al., 2001].

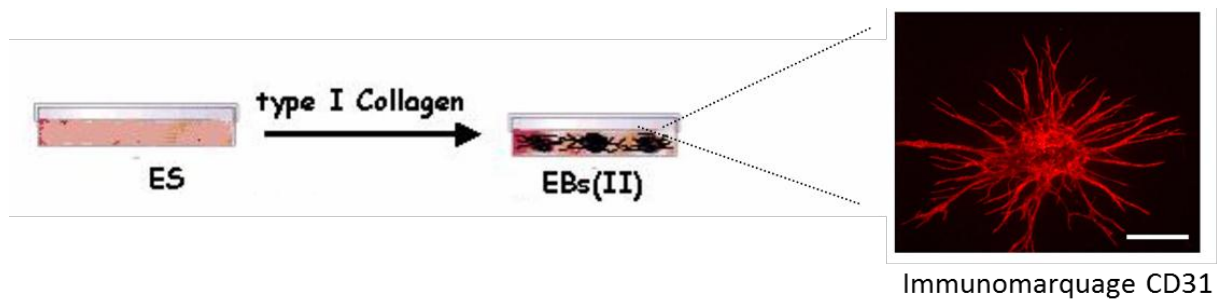


Figure 39 : Modèle en une étape de différenciation endothéliale de cellules souches embryonnaires murines.

(Test développé en collaboration avec Daniel Vittet)

Ce modèle très complet alliant à la fois les étapes précoces de la vasculogénèse et de l'angiogénèse permet des études qualitatives (expression de protéines) et quantitatives (longueur des bourgeons). Il est toutefois délicat et long à mettre en œuvre et c'est un procédé multi-étapes qui n'est pas adapté au test en parallèle de nombreuses molécules, mais reste très informatif en seconde intention.

4.1.6 Limites des tests d'angiogénèse *in vitro*

Les tests d'angiogénèse *in vitro* sont très utiles car ils peuvent être mis en œuvre facilement, sont quantifiables et représentent une première étape essentielle pour la validation de composés potentiellement anti-angiogènes. Néanmoins, ils restent limités car ils ne tiennent pas compte de tous les facteurs environnementaux de l'angiogénèse physiologique et tumorale (inflammation, présence de cytokines, matrice extracellulaire, flux sanguin...) et doivent être interprétés avec précaution. Les principales limitations des modèles *in vitro* sont les suivants :

- 1) Les différents types endothéliaux peuvent avoir des propriétés différentes.
- 2) Une culture cellulaire ne reproduit pas le microenvironnement d'un organe.
- 3) Pour la plupart, les tests ne reproduisent pas les interactions hétéro-cellulaires.
- 4) Les cellules endothéliales en culture tendent à perdre leur état de différenciation, et perdent le phénotype spécifique de l'organe dont elles sont issues. Cela se traduit par un changement de caryotype, des modifications dans l'expression des antigènes de surface (diminution de l'expression de CD34 [Delia et al., 1993]), des changements dans les jonctions [Wolburg et al., 1994] et dans leur prolifération [Jackson and Nguyen, 1997].

Diversifier le nombre de modèles d'étude permet de conforter des résultats mais les tests sur des modèles d'angiogénèse *in vivo* sont un moyen plus efficace et plus précis pour valider une molécule d'intérêt.

4.2 Tests d'angiogenèse *in vivo* : implantation d'éponge chez des souris

Les tests *in vivo* sont plus délicats à mettre en œuvre et font appel à la chirurgie sur les animaux de laboratoire. L'avantage est de replacer l'angiogenèse dans un contexte physiologique mais l'inconvénient est que le nombre d'expériences pouvant être menées est plus limité et il est nécessaire de définir l'espèce la plus adaptée à l'étude.

Le modèle d'implantation d'éponge sous la peau de souris est un test d'angiogenèse simple dans un contexte physiologique et qui peut être associé à de l'imagerie non-invasive. Les éponges de celluloses imprégnées du facteur de croissance FGF-2 sont implantées en sous-cutanée. Une réponse angiogénique se développe et des capillaires sanguins envahissent l'éponge. L'ajout de facteurs pro ou anti-angiogène influencent la réponse angiogénique [Keramidas et al., 2013a].

Par ailleurs, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ peu exprimée sur les vaisseaux quiescents est au contraire fortement exprimée sur la néovasculature [Stromblad and Cheresh, 1996]. Un pentapeptide cyclique présentant une séquence RGD (arginine-glycine-acide aspartique) reconnaît spécifiquement cette intégrine [Aumailley et al., 1991]. Cette propriété a été mise à profit en couplant de manière covalente des groupements RGD cycliques sur un décapeptide cyclique : RAFT. Un fluorophore a été greffé de façon stéréosélective sur l'autre face du décapeptide cyclique, formant ainsi un marqueur fluorescent de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [Garanger et al., 2005]. Ce produit est commercialisé sous le nom Angiolone™. Il permet la visualisation de l'accumulation de fluorescence sur les néovaisseaux se formant à la surface de l'éponge permettant ainsi une quantification de l'angiogenèse [Keramidas et al., 2013a] et une reconstruction en trois dimensions de la vascularisation. L'angiogenèse quantifiée par cette technique a pu être corrélée à la quantité d'hémoglobine mesurée dans l'éponge.

4.3 Autres tests d'angiogenèse *in vivo*

D'autres tests d'angiogenèse *in vivo* et *ex vivo* sont utilisés. On peut citer entre autres, le test d'angiogenèse sur la membrane chorioallantoïque (CAM) du poulet [Brooks et al., 1999]. Un trou dans la coquille d'un œuf de poule fécondé permet d'accéder à la CAM et de déposer les molécules à tester sur un support (gélatine, polymère). L'expérience peut être conduite sur une longue période pendant que l'embryon continue à se développer.

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est également un modèle d'angiogenèse *in vivo* bien développé et qui génère un très grand nombre d'embryons à chaque ponte. La transparence des embryons facilite l'observation du développement de la vascularisation. Les mécanismes et de nombreux gènes de la vasculogénèse du poisson-zèbre sont communs avec ceux des mammifères.

Le développement de la vascularisation de la rétine de souriceaux nouveau-nés est également un excellent modèle pour l'étude de l'angiogenèse physiologique. En effet, les souriceaux naissent avec une vascularisation rétinienne immature qui va se développer de façon centripète depuis le centre de la rétine vers l'extérieur pendant les 7 premiers jours post-nataux [Dorrell and Friedlander, 2006]. Ce modèle est particulièrement intéressant pour l'étude des pathologies oculaires liées à un défaut d'angiogenèse [Gariano and Gardner, 2005].

5 Criblage à haut débit pour l'identification de nouvelles molécules à potentiel thérapeutique

5.1 Introduction au criblage

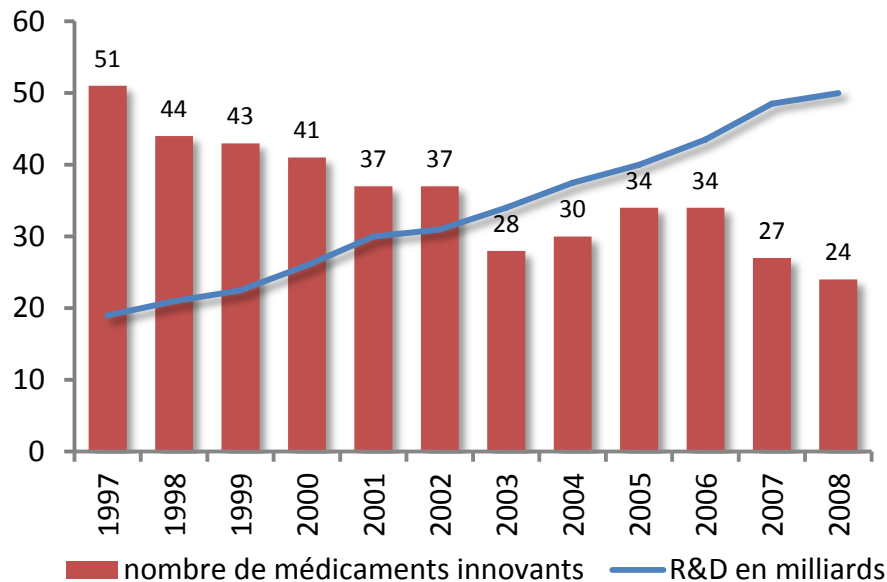
Le criblage à haut débit ou high throughput screening (HTS) est apparu dans les années 1980 dans l'industrie pharmaceutique. Ce procédé est né du besoin pour l'industrie pharmaceutique d'effectuer un criblage rapide d'une grande quantité de molécules chimiques (chimiothèques).

Le principe du criblage consiste à déposer sur un test cellulaire ou moléculaire à l'aide d'un robot de criblage, un nombre important de composés dans un temps court et d'identifier de nouveaux composés biologiquement actifs [White, 2000] [Fox et al., 1999] (Figure 40). Le premier criblage en France, a été réalisé par Rhône-Poulenc sur 25 000 micro-organismes testés sur des antibiotiques.



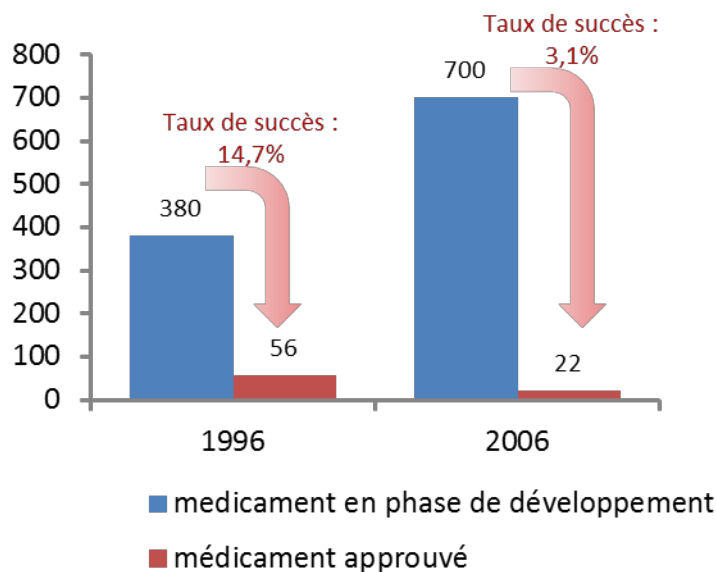
Figure 40 : Robot de la plateforme de criblage à haut débit du CEA –Grenoble.
(CMBA Equipe pour le Criblage de Molécules Bio-Actives)

Un des critères recherché par l'industrie pharmaceutique est le coût moindre qu'il engendre dans le développement d'un médicament dont le processus complet est actuellement estimé à 800 millions d'euros et long (de 10 à 15 ans). Le graphique 1 et le graphique 2 montrent que les investissements des industries pharmaceutiques ont considérablement augmenté ces dernières années mais que parallèlement le nombre des médicaments mis sur le marché a quant à lui diminué. Cela est dû aux exigences gouvernementales de garantir l'efficacité et la non-toxicité des médicaments proposés et au retrait des molécules considérées comme n'apportant pas de bénéfices substantiels en matière de santé.



graphique 1 : Nombre de médicaments mis sur le marché américain entre 1997 et 2008, et les investissements R&D des industries pharmaceutiques américaines.

(Source : IMS Health et PhRMA, juin 2009)



graphique 2 : Médicaments en essais cliniques et autorisés par la FDA.

(Source EFPIA, 2007)

Parallèlement, le coût de développement d'un médicament est passé de 150 millions de dollars en 1980 à 1500 millions en 2006 (source : Clayton Christanson, Morgan Stanley Research, janvier 2010). Néanmoins, le coût d'un criblage n'est pas négligeable car il nécessite de la main-d'œuvre, le prix des réactifs biologiques est élevé tout comme le

stockage, l'achat ou la gestion de la chimiothèque. Le coût estimé du criblage d'une molécule est compris entre 0.3€ et 3€.

Si dans un premier temps, les tests de criblage ont été effectués sur des protéines purifiées, ils ont ensuite cédé la place à des tests cellulaires plus sophistiqués qui permettait d'avoir la cible recherchée dans un contexte plus proche du contexte physiologique. Par exemple, l'utilisation de tests cellulaires permet aisément de distinguer les molécules qui pénètrent les cellules de celles qui n'agissent qu'en surface. Le criblage des molécules d'intérêt se trouve donc facilité.

Enfin, si le criblage à haut débit a pu prendre un essor important c'est qu'il s'appuie sur le traitement automatisé de lecture des tests et l'analyse bioinformatique des données.

5.2 Critères d'éligibilité d'un criblage

Les tests *in vitro* utilisés en biologie cellulaire et analyses biochimiques ne sont pas toujours adaptés au criblage. En effet, pour qu'un test phénotypique puisse être adapté au criblage à haut débit, il doit répondre à différents critères d'exigence :

- La miniaturisation : le test doit pouvoir être adapté au format microplaque (96 ou 384 puits), et se réaliser dans un petit volume réactionnel. Le choix d'un modèle simple optimise les possibilités de standardisation et de développement technologique de modèles *in vitro* existants, comme dans le modèle d'angiogenèse basé sur le test de blessure [Gough et al., 2011].
- Le niveau de détection (fluorescence, luminescence) doit être suffisamment sensible et pouvoir être facilement quantifiable (automatisation de l'acquisition et du traitement informatique des données). L'amélioration des systèmes d'acquisition et des techniques d'imagerie ont été particulièrement développées notamment dans les tests de criblage de molécules anti-angiogènes [Evensen et al., 2010a; Evensen et al., 2010b].
- Le test doit être rapide (high throughput).
- Les résultats doivent être fiables, robustes et reproductibles. Ils doivent permettre de discriminer parmi tous les composés testés ceux qui auront une activité biologique significative. Le plus souvent, les composés sont testés en simple ou duplicate, la confiance que l'on peut accorder au test doit donc être la plus grande possible.

Pour juger de la fiabilité d'un test, le groupe de Zhang [Zhang et al., 1999] a proposé une méthode de calcul permettant de mesurer un paramètre statistique le facteur Z'. Ce coefficient permet de prendre en compte la dynamique du signal mesurée d'une part et d'autre part la variation des données liée à la mesure du signal. Il est calculé de la manière suivante :

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

où

σ_p = déviation standard des contrôles bio-inactifs

σ_n = déviation standard des contrôles bio-actifs

μ_p = moyenne de signal des contrôles bio-inactifs

μ_n = moyenne de signal des contrôles bio-actifs

Plus les écarts-type sont petits (reproductibilité) et/ou plus la différence des moyennes est grande (grande fenêtre dynamique), plus on se rapproche de 1. Un test robuste doit présenter un facteur Z' supérieur à 0,5 pour permettre de cribler les molécules en simplicate. En incluant des contrôles sur chaque plaque de test il devient facile de calculer ce facteur et d'attester de la fiabilité du test.

5.3 Choix d'une chimiothèque

Une chimiothèque regroupe des molécules qui sont des composés synthétisés par des chimistes ou issues d'échantillons naturels. En pratique, les molécules d'une même chimiothèque sont préparées à la même concentration, dans le même solvant et préparées dans des plaques au format 96 puits ce qui permet un transfert direct et automatisé de la plaque des composés à la plaque de criblage par un robot. Les chimiothèques peuvent être institutionnelles ou appartenir à des sociétés privées (Tableau 7).

Chimiothèque	Nombre de composés
Prestwick	1 120 médicaments
Sanofi	> 10 ⁶ molécules
CNRS DCM Grenoble	1360 molécules
Chimiothèque nationale	640 molécules dans la chimiothèque essentielle (sélection selon des critères de diversité optimale)
NCI	260 000 molécules
Institut Curie	6 560 molécules

Tableau 7 : Exemples de chimiothèques.

La première chimiothèque est apparue dans les années 1990, et cette pratique s'est ensuite rapidement étendue. La chimiothèque de Sanofi comporte aujourd'hui à elle seule, un million de composés.

Malgré la diversité des composés proposés sur une chimiothèque, certaines limites sont apparues. En effet, une chimiothèque notamment celles issues de la chimie combinatoire ne contiennent qu'une faible partie de tous les composés possibles et ces molécules peuvent n'avoir aucune structure similaire aux ligands de la cible choisie pour le criblage. De fait,

dans cette approche avec des molécules très variées dont on ne connaît pas le spectre d'activité, il s'est avéré difficile d'obtenir des antagonistes, ligands ou agonistes de meilleure affinité que les ligands naturels de la cible choisie.

De nouvelles chimiothèques dites « orientées » sont alors apparues [Lazo and Wipf, 2000]. La connaissance structurale de la cible permet de regrouper dans la chimiothèque des molécules possédant des motifs structuraux identifiés comme éléments de liaison aux protéines d'intérêt, en prêtant attention à la solubilité, au nombre de sites donneurs ou accepteurs de liaisons hydrogènes, la lipophilie, l'absorption ou la biodisponibilité. A ce stade, la chimie des substances naturelles a rencontré un vif intérêt car elle comprend de nombreuses molécules dotées de capacité d'interaction avec les protéines ou les acides nucléiques.

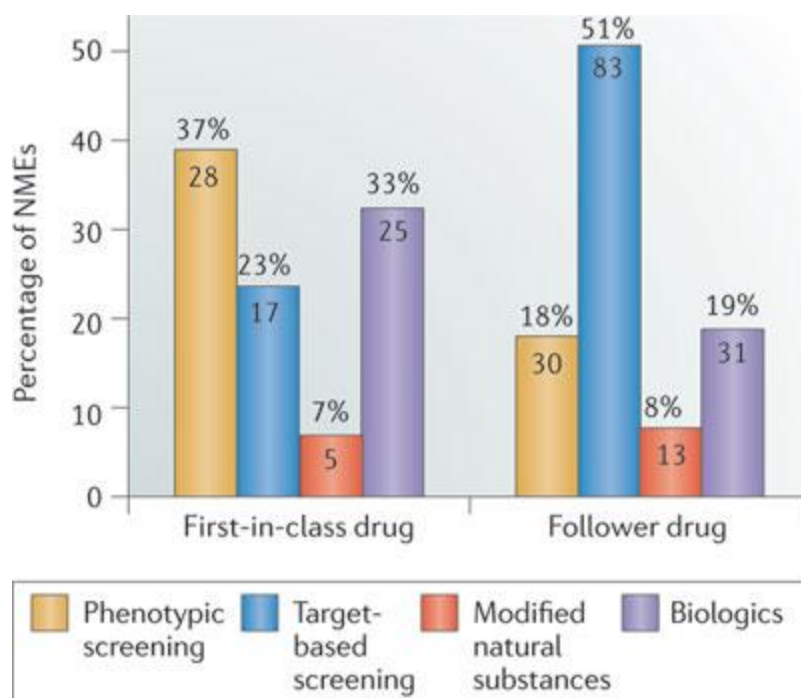
Une autre chimiothèque intéressante est celle de Prestwick. Dans cette chimiothèque, les molécules regroupées sont des composés ayant déjà une application thérapeutique reconnue pour une pathologie donnée. L'idée est de trouver si un médicament pourrait être utilisé dans le traitement de plusieurs pathologies. Ces molécules ayant déjà un agrément la mise sur le marché ultérieure s'en trouve facilitée du fait notamment que toutes les étapes de cytotoxicité, pharmacocinétique et pharmacodynamique ont été préalablement réalisées.

Enfin, il existe des chimiothèques dites « virtuelles » où l'étude des molécules et de la relation à sa cible potentielle portent sur des données bioinformatiques. Il s'agit dans ce cas d'un criblage prédictif *in silico*.

L'avantage indéniable pour le développement d'un candidat-médicament est que la même molécule peut être testée dans de nombreux systèmes cellulaires, d'interaction récepteur-ligand, et peut se révéler avoir plusieurs cibles.

5.4 Les résultats obtenus

Depuis ces dix dernières années, plus d'une cinquantaine de médicaments issus du criblage à haut débit ont été mis sur le marché [Swinney and Anthony, 2011]. Deux approches sont essentiellement utilisées pour découvrir de nouvelles molécules : l'approche par criblage phénotypique ou l'approche moléculaire ciblée, basée sur une hypothèse biologique. Au cours des dernières années (Graphique 3), le criblage phénotypique a permis la découverte d'un nombre supérieur de composés, premiers dans leur classe de médicaments (first in class) avec un nouveau mécanisme d'action par rapport à l'approche ciblée. Cette méthode a quant à elle plus largement favorisée la mise sur le marché de médicaments de seconde génération (follower drug).



Graphique 3 : Répartition des médicaments mis sur le marché entre 1999 et 2008 en fonction de leur stratégie de développement.

NMEs : New Molecular Entities.

En ce qui concerne plus particulièrement le développement de médicaments anti-angiogéniques, le criblage à haut débit a connu également quelques succès. Les premières campagnes de criblage ont effectivement visé à trouver des molécules capables d'inhiber l'activité kinase des récepteurs tyrosines kinases (VEGFR, FGFR et PDGF) qui jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse, mais également les effecteurs des voies de signalisation (signalisation MAP-Kinase, p38).

Un des premiers succès de ce type de criblage fut la découverte du sorafenib, identifié comme étant un inhibiteur de la kinase Raf et pour lequel une activité anti-VEGFR et anti-PDGFR a par la suite été démontrée [Wilhelm et al., 2006]. Quelques années auparavant, Mitchison et Schreiber [Haggarty et al., 2000] avaient découvert par criblage le monastrol. Il s'agissait de la première petite molécule anti-mitotique qui ne cible pas la tubuline mais une protéine moteur, la kinésine 5. Cela a montré que la démarche du criblage avait un intérêt pour les équipes de recherche fondamentale. En effet, identifier le mécanisme d'action ou les cibles des touches d'un criblage peut amener à identifier des protéines impliquées dans un processus cellulaire ou de nouveaux partenaires jusqu'alors inconnus. C'est dans cet objectif que nous avons entrepris un criblage cellulaire à partir d'un test d'angiogenèse afin d'approfondir nos connaissances de l'angiogenèse à travers l'action d'un inhibiteur original.

5.5 Perspectives

Le criblage initial sur des cibles telles que les récepteurs a fait place maintenant au criblage appelé à haut contenu (high content screening ou HCS).

Afin de s'approcher au plus près de la réalité physiologique, les tests se sont perfectionnés pour ne pas utiliser que les seules lignées cellulaires exprimant de manière endogène ou surexprimant la protéine cible. En effet, dans le cas des lignées cellulaires les voies de l'apoptose, survie, prolifération sont affectées. La mise en place de criblage à haut débit sur des cellules dans un contexte plus physiologique permet de rechercher des activités de molécules sur les voies de signalisation, relation cellule-cellule, apoptose, enzymologie. Néanmoins, ce type de criblage est délicat à mettre en œuvre et se révèle coûteux et plus long car il nécessite une étape de sélection des cellules au préalable.

Ce type de criblage représente une grande avancée, car il est une alternative au modèle animal et cible la cellule impliquée dans le projet thérapeutique.

Le criblage permet d'identifier « des touches » c'est-à-dire des molécules biologiquement actives dans un système *in vitro* à une concentration donnée. A ce stade, les molécules peuvent être brevetées en tant que médicament potentiel. C'est là, la première étape, car l'efficacité de la molécule doit ensuite être validée dans des tests secondaires plus sophistiqués allant jusqu'à permettre la compréhension de son mécanisme d'action, et en finalité l'identification de sa cible si celle-ci n'était pas connue.

A ce stade, la molécule devient une molécule au mécanisme original (first in class) dont la pharmacochimie permet d'optimiser son affinité, sa biodisponibilité et sa toxicité. Dans une visée thérapeutique, l'efficacité du candidat médicament devra être évaluée chez l'animal. Aussi, si le criblage à haut débit est prometteur dans l'identification de molécules potentiellement thérapeutique [Panchagnula and Thomas, 2000] et pourrait réduire le temps d'élaboration de produits pharmaceutiques, une limitation apparaît due à l'évaluation clinique dans les phases I à IV avant l'acceptation du médicament qui, elles, restent incompressibles.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'angiogenèse est impliquée dans un grand nombre de pathologies allant de l'inflammation chronique, à la dégénérescence maculaire liée à l'âge et au cancer où elle concourt à l'activité métastatique de la tumeur. La découverte du VEGF comme principal acteur de l'angiogenèse a donné naissance à un grand nombre de stratégies thérapeutiques visant à inhiber son activité. Ces thérapies connaissent un certain succès ; néanmoins, après quelques mois, un grand nombre de tumeurs acquièrent des résistances et échappent au traitement. Il y a donc une réelle nécessité de proposer de nouveaux composés anti-angiogènes administrables en seconde intention en alternative thérapeutique.

Dans ce contexte mon projet était d'identifier de nouveaux composés à activité anti-angiogène. Le laboratoire BCI (Biologie du Cancer et de l'Infection), Equipe Angiogenèse, s'intéresse aux mécanismes de l'angiogenèse et au développement de thérapies anti-angiogènes. Sur le site du CEA qui nous héberge, nous avons accès à une plateforme de criblage à haut débit de molécules bio-actives (CMBA). Dans le but de développer ces nouveaux composés, notre stratégie a été d'utiliser un test d'angiogenèse sur cellules endothéliales pour réaliser un criblage à grande échelle de molécules novatrices. Pour cela, nous avons choisi de cribler une chimiothèque académique (Université de Grenoble) contenant des molécules originales.

Nos objectifs étaient de différents ordres :

- ✓ Dans un premier temps, faire la preuve de concept du criblage.
- ✓ Puis, identifier une molécule d'intérêt et réaliser une étude structure-activité en collaboration avec nos collègues chimistes (Martine Demeunynck et Jean-François Constant) pour obtenir une molécule plus efficace.
- ✓ Confirmer par des tests *in vitro* et *in vivo*, l'activité anti-angiogène de la molécule d'intérêt.
- ✓ Evaluer l'activité anti-tumorale de la molécule.
- ✓ Comprendre le mécanisme d'action de la molécule et identifier sa cible moléculaire.

Ce dernier point est particulièrement intéressant, car il peut apporter des connaissances nouvelles dans un processus comme l'angiogenèse. En partant d'un criblage phénotypique, nous avons analysé et détaillé le mécanisme d'action d'un inhibiteur du processus angiogénique. Un de nos objectifs a par la suite été de mieux connaître les voies de signalisation du VEGFR-2 dont certains aspects sont encore méconnus, d'étudier les différents partenaires de cette voie et de trouver comment notre molécule pouvait interagir dans cette cascade moléculaire.

RESULTATS

Dans cette partie, le corps de mes résultats sera présenté sous la forme d'un article soumis à publication, suivi d'une discussion, puis des résultats complémentaires seront détaillés. Ils s'articulent autour de trois axes : le criblage de la chimiothèque et l'identification de la molécule leader COB223, caractérisation de l'effet anti-angiogène et anti-tumoral de COB223 *in vitro* et *in vivo*, et la recherche du mécanisme d'action de COB223.

J'ai réalisé l'ensemble des expériences présentées dans cet article et le brevet à l'exception de l'imagerie par fluorescence chez la souris qui a été menée en collaboration avec Michelle Keramidas et le Dr. Jean-Luc Coll à l'Institut Albert Bonniot (UMR 823, Grenoble).

Identification of a chemical inhibitor of angiogenesis and tumorigenesis that targets the Ras-Raf-ERK signaling pathway

Agnès Desroches-Castan^{1,2,3}, Delphine Quélard^{1,2,3,4}, Martine Demeunynck^{2,5}, Jean-François Constant^{2,6}, Chongling Dong^{2,6}, Michelle Keramidas^{2,7}, Jean-Luc Coll^{2,7}, Caroline Barette^{2,3,8}, Laurence Lafanechère^{2,3,7}, Jean-Jacques Feige^{1,2,3}

1 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1036, Biology of Cancer and Infection, Grenoble, F-38054, France 2 : Univ. Grenoble-Alpes, Grenoble, F-38041, France 3 : Commissariat à l'Energie Atomique (CEA), DSV/iRTSV, Grenoble, F-38054 4 : present address : Janssen, Pharmaceutical Companies of Johnson and Johnson, Issy-les-Moulineaux, F-92130, France 5 : Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 5063, Department of Molecular Pharmacology, Grenoble, F-38041, France 6 : Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 5250, Department of Molecular Chemistry, Grenoble, F-38041, France 7 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 823, Albert Bonniot Research Center, La Tronche, F-38700, France 8 : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 1038, Large Scale Biology, Grenoble, F-38054, France

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

The efficacy of anti-angiogenic therapies on cancer patients is limited by the emergence of resistance and by unpredictable differences in individual responses. This stimulates the search for alternative drugs that would block tumor angiogenesis through distinct mechanisms. In this study, we screened an academic chemical library (DCM, University of Grenoble-Alpes) and identified a leader molecule, COB223, that inhibits endothelial cell migration and proliferation. COB223 does not affect 3T3 fibroblast proliferation but is also cytostatic on Lewis lung carcinoma (LLC) cells. The anti-angiogenic activity of COB223 was confirmed using several *in vitro* assays and an *in vivo* model of FGF2-soaked cellulose sponges implanted under the skin of mice. In a mouse tumor model developing from subcutaneously implanted LLC cells, we observed that ip administration of doses as low as 4 mg/kg COB223 efficiently reduced the growth rate of tumors without any apparent secondary effect. We analyzed the mechanism of action of COB223 and observed that it inhibits endothelial cell ERK1/2 phosphorylation induced by VEGF, FGF-2 or serum. Detailed analysis of the ERK signaling pathway allowed us to conclude that COB223 acts downstream of PKC and upstream of Ras. This chemical molecule represents a novel anti-angiogenic and anti-tumorigenic compound with an original mechanism of action that deserves further development as an anti-cancer drug.

angiogenesis | cancer therapy | VEGF | Ras | ERK

It is now well accepted that angiogenesis is a rate-limiting step in tumor progression (1). Deciphering the molecular mechanisms of tumor angiogenesis has recently allowed successful translation into clinical applications. Novel classes of anticancer drugs that specifically target tumor endothelial cells have been developed and several clinical trials have demonstrated their benefits in the treatment of distinct types of metastatic cancers (2, 3). These include the neutralizing anti-VEGF antibody bevacizumab, the soluble binding domain of VEGF receptors aflibercept and several small tyrosine kinase inhibitors targeting VEGF receptor and other kinases, including sorafenib, sunitinib, pazopanib and regorafenib. However, up to now, none of the anti-angiogenic drugs that were approved on the pharmaceutical market can irreversibly stop tumor progression and turn back cancer tumors into their dormant state. The major problems encountered with anti-angiogenic drugs are that a hardly predictable but consistent percentage of patients are or become resistant to these therapies (2, 4). There is thus a strong need to develop second-generation anti-angiogenic drugs that could be used in second line in resistant patients.

In this work, we screened the recently built-up library of the Department of Molecular Chemistry from the University of Grenoble (France) for compounds that can efficiently inter-

fere with the angiogenic process. Such phenotypic screens - in which a compound collection is directly assayed on cells - are extremely effective to discover drugs with new mechanism of action without any *a priori* on their biological target. Indeed, a recent survey has established that the vast majority of first-in-class drugs were identified by phenotypic screening (5). Although small (1360 molecules), this library presents the advantage of containing original non-commercial molecules. We adapted the endothelial cell scratch-wounding assay to the 96-well microplate format, since this assay correlates well with the *in vivo* angiogenic response (6). Using this assay, we selected a family of polyamine derivatives that potently inhibit endothelial wound healing. We further assessed their anti-angiogenic and anti-tumorigenic potencies in a series of *in vitro* and *in vivo* assays. We also succeeded at identifying the mechanism of action of the leader molecule that appears to inhibit the Ras/Raf/ERK pathway upstream of Ras and downstream of the activated growth factor receptors.

Materials & Methods:

Cell Culture, small molecules and reagents:

HMEC-1, HMEC-GFP, NIH-3T3, and 3T3-GFP were maintained in DMEM 1g/L glucose (Invitrogen) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS). Human dermal microvascular en-

Significance

Inhibition of tumor vascularization by anti-angiogenic molecules has recently emerged as a complementary anti-tumoral strategy in the toolbox of oncologists. However, despite their success, the first-generation molecules are not as efficient as expected due to the emergence of resistance to these treatments. There is thus a strong demand for second-generation molecules that would inhibit angiogenesis through distinct mechanisms. This study shows the characterization of such a compound that was identified by screening an academic chemical library. The leader compound is anti-angiogenic and anti-tumorigenic in mouse tumor models. This promising compound appears to act upstream of the Ras/Raf/ERK mitogenic signaling cascade and to target both tumor cell and vascular endothelial cell proliferation.

Reserved for Publication Footnotes

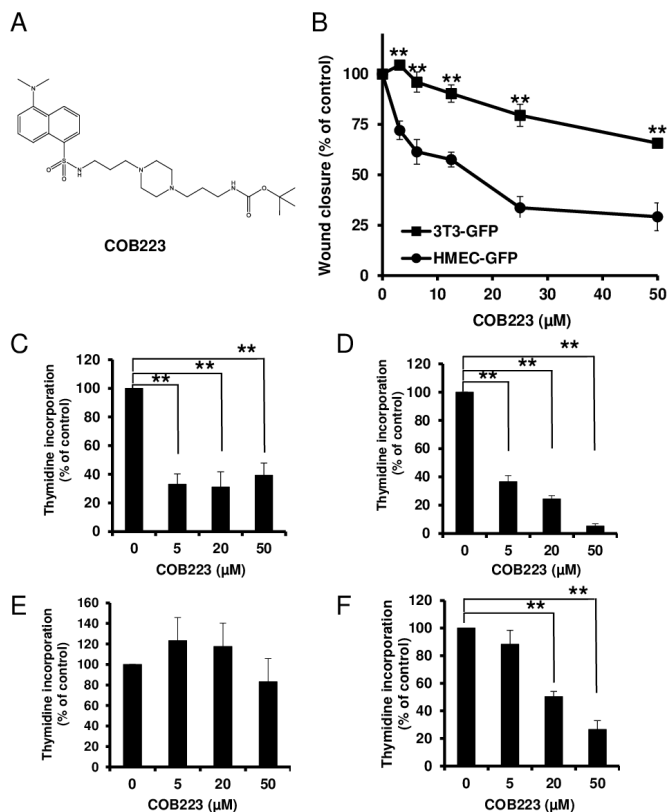


Fig. 1. : Effect of COB223 on cell migration and cell proliferation (A) Chemical structure of the leader compound COB223. (B) the dose-dependent effect of COB223 on cellular wound closure was measured as described in Material and Methods on either HMEC-GFP (circles) or 3T3-GFP (squares). (C-F) Cell proliferation was assayed by measuring ³H-thymidine incorporation into HMVECd (C), HUVEC (D), 3T3 (E) or LLC2 (F) cell cultures as described in Material and Methods. The results are expressed as means \pm SEM from 3 independent experiments. ** : p < 0.01

endothelial cells (HMVEC-d) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (Lonza) were maintained in endothelial growth medium (EGM-2-MV, Cambrex) supplemented with 5% FCS and additives recommended by the manufacturer. CJ7 embryonic stem cells were cultured on 1% gelatin-coated dishes in Iscove's medium containing Glutamax (Iscove's modified Dulbecco's medium; Invitrogen) and supplemented with 15% FCS, 1% non-essential amino-acids, 1% ATAM, 150 μM monothioglycerol and 1000 U/mL of leukemia inhibitory factor (Chemicon). MCF-10A cells stably overexpressing oncogenic Ras^{G12V} were kindly provided to us by Dr O. Filhol (BCI lab, Grenoble, France). CCL-39 fibroblasts expressing a constitutively active Raf in an estrogen-responsive manner (7) were a generous gift from Dr G. Pagès (IRCAN, Nice, France). Unless otherwise indicated, antibodies were purchased from Cell Signaling, except for anti-phospho-MAPK (Promega), anti-MAPK (Sigma) and anti-c-Raf (BD Biosciences).

Specific methods are described in Supplementary Information (SI Text).

Results:

Setting up the HTS screening assay:

In order to adapt the endothelial scratch wounding assay to the constraints of high throughput screening, we decided to use an endothelial cell line rather than primary cultures for the sake of reproducibility. Since angiogenesis is triggered by capillary endothelial cells, we selected the HMEC-1 cell line which consists of human dermal microvascular endothelial cells stably

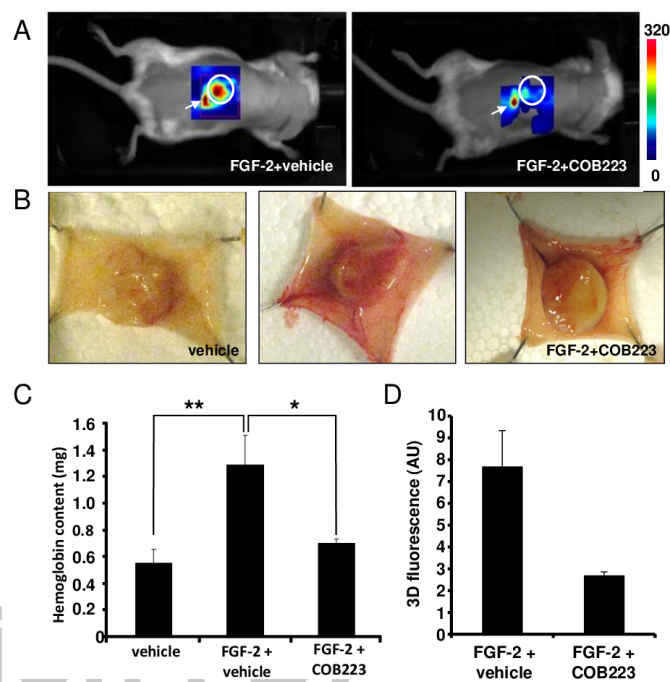


Fig. 2. : In vivo effects of COB223 on angiogenesis in the mouse sponge assay Cellulose sponges were implanted under the dorsal skin of Balb/c mice and injected several times with FGF-2 and either COB223 or its vehicle as described in Material and Methods. (A) At the end of the experiment (day 7), the neovasculature was visualized by non-invasive fluorescence imaging (see details in Material and Methods). (B) The mice were then sacrificed and the dorsal skin flaps were surgically collected and photographed. (C) The sponges were homogenized and their hemoglobin content was measured. (D) Intensity of fluorescence observed in the sponges in (A). In (A) and (D), 2 mice were analyzed in each group. In (B) and (C), 7 mice were analyzed in each group. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01

expressing SV40 middle T antigen (8). We infected this cell line with GFP-encoding retroviral particles and selected one clone (thereafter named HMEC-GFP) that presented a high level of fluorescence and a strong proliferation rate (doubling time in the presence of serum: 22 h). We controlled that GFP expression was stable over at least 50 passages and that these cells still expressed endothelial markers such as VE-cadherin and CD31. In a standard assay, HMEC-GFP cells were grown until confluence in 96-well plates in the presence of serum, scratched with the multi-tip dispenser of the HTS automat, gently rinsed twice to eliminate detached cells and cell debris that could liberate inflammatory and potentially angiogenic cytokines, and incubated for 24 h in the presence of serum and the compounds to be tested. Each well was photographed at time 0h (after wounding) and 24h under a motorized epifluorescence microscope and the digitized images were analyzed using Image J to determine the percentage of wound closure (Fig. S1). Under our standard conditions, the closure rate was 72 ± 4 % in the positive controls and 27 ± 4 % in the negative controls. The reproducibility of the assay allowed us to calculate a z' factor of 0.59, which indicated that this test was compatible with high-throughput screening requirements (9).

Identification of polyamine derivatives as inhibitors of endothelial cell migration:

Using this assay, we screened the academic library of the University of Grenoble, which is composed of 1360 original molecules. Setting the threshold of significant responses at 75% of the maximal inhibition, we identified 80 inhibitory molecules. At this stage, we reasoned that molecules that would affect the cytoskeleton dynamics or the adhesion properties of any cell type would be positive in this assay but would not repre-

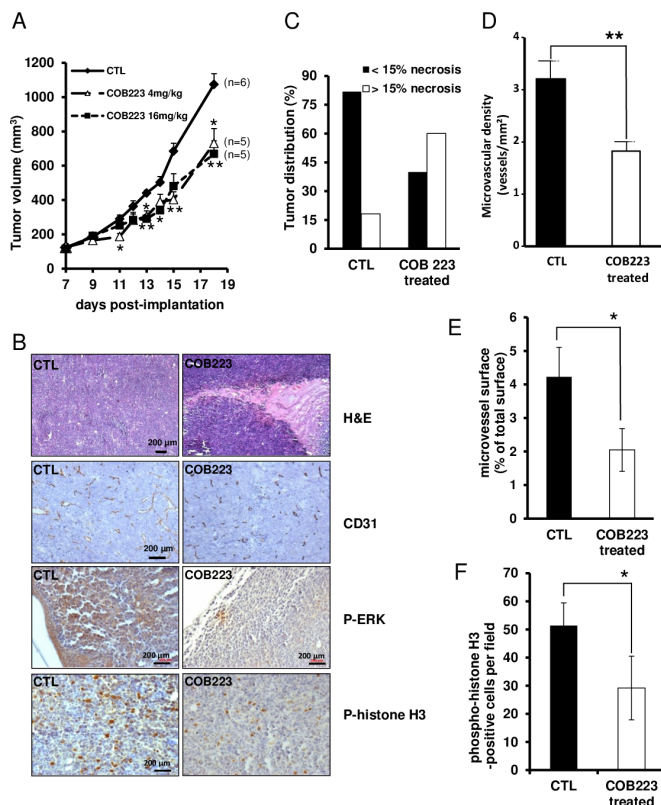


Fig. 3. : *In vivo* effects of COB223 on LLC/2 tumor formation (A) LLC/2 cells were injected under the skin of nude mice. Once the tumors had reached a size of 50 mm³, the mice were injected i.p. every other day either with 4 mg/kg or 16 mg/kg of COB223 or with vehicle alone. The volume of the tumors is plotted versus time. (B) Tumor sections from control and COB223-treated animals were stained with haematoxylin&eosin (revealing pale necrotic area) and immunostained with anti-CD31 antibodies (blood vessels), anti-phospho-ERK1/2 and anti-phospho histone H3 (proliferation status). (C) 3 sections from each tumor were analyzed to determine which percentage of the tumors presented with more than 15% of their surface as necrotic. 10 control and 15 COB223-treated tumors were used in this analysis. (D-E) Image analysis of the CD31 immunostainings allowed to quantify microvessel density (D) and microvessel size (E). (F) Image analysis of the mean number of phospho-H3-positive nuclei per field in control and COB223-treated tumor sections.

sent good candidates for further development. We thus decided to perform a secondary counterscreen of the first 80 selected compounds on GFP-expressing 3T3 fibroblasts (3T3-GFP) using the same scratch assay. We then focused our interest on the 5 molecules that inhibited more strongly HMEC-GFP than 3T3-GFP wound healing. Among the most active molecules were several polyamine derivatives. We synthesized a series of 30 analogs and tested them at various concentrations both on HMEC-GFP and 3T3-GFP cells. The IC₅₀ of these molecules for wound healing inhibition on both cell types is presented in Table S1. The most potent compound on HMEC-GFP was COB223 with an IC₅₀ of 5 μM (Figure 1 A, B). COB223 was 5 times less efficient at inhibiting wound closure of 3T3-GFP cells (Figure 1B). COB227 was also an interesting compound as, although its IC₅₀ on HMEC-GFP (18 μM) was larger than that of COB223, its specificity for endothelial over fibroblastic cells was better (Ratio of IC₅₀s = 14). The structure-activity relationship analysis indicated that aliphatic polyamines (ethylenediamine, diamino-propane, putrescine) or dansyl-cadaverine were inactive on both cell types. Careful analysis of the efficacy of the series of 30 analogs indicated that inhibition requires the presence of two hydrophobic substituents linked through amino/amido-containing

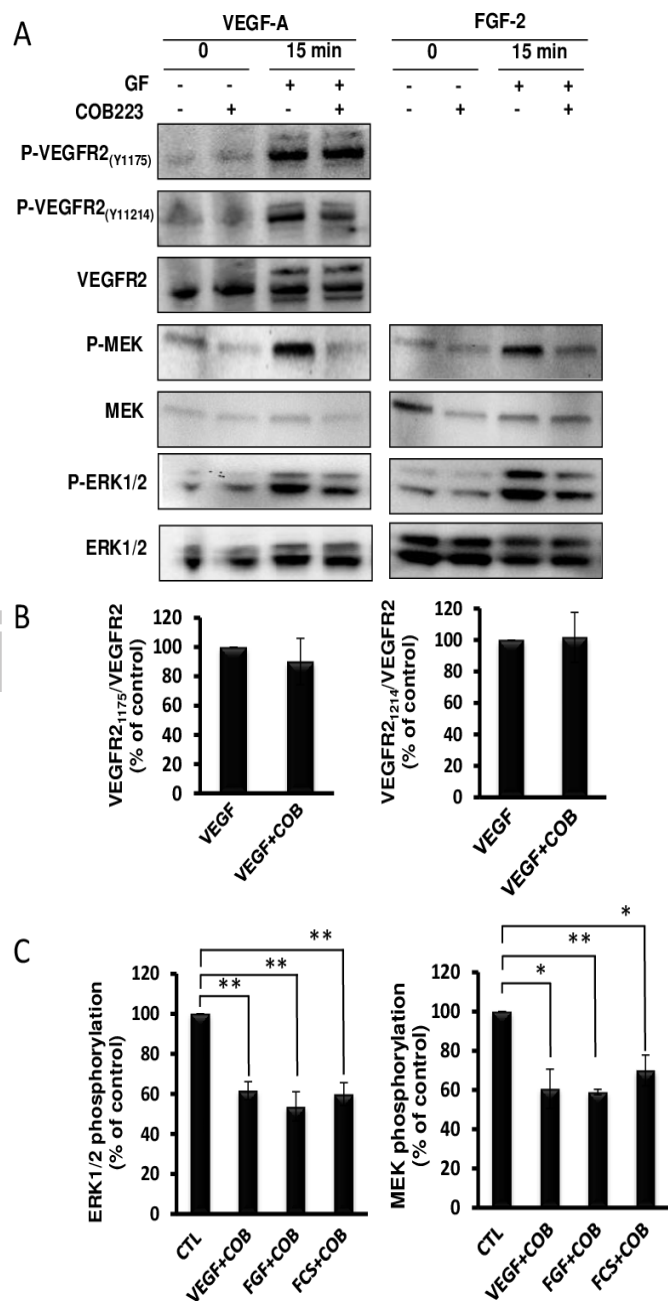


Fig. 4. : Effect of COB223 on growth factor-induced VEGF-R2, MEK and ERK phosphorylations (A) Serum-starved HUVEC cells were incubated for 15 min in the presence of either 10 ng/mL VEGF-A or 20 ng/mL FGF-2 and in the absence or the presence of 25 μM COB223. The phosphorylations of VEGFR2 on tyrosine 1175 or tyrosine 1214, of MEK and ERK1/2 were then analyzed by Western blot analysis of the cell lysates as described in Material and Methods. Western blots for total VEGFR2, MEK and ERK1/2 were used as loading controls. (B) The hybridization signals observed in A were quantitated and the ratios between phospho-VEGFR2(Y1175) or (Y1214) and VEGFR2 signals were normalized to the value observed in the absence of COB223. (C) The hybridization signals observed in A were quantitated and the ratios between phospho-ERK1/2 and ERK1/2 and between phospho-MEK and MEK were normalized to the values observed in the absence of COB223. Additional experiments performed with 10% fetal calf serum (FCS) as a mitogen were included in this analysis. At least 5 experiments were analyzed per condition. * : p < 0.05 ; ** : p < 0.01

chains. Dansyl and naphthalimide aromatic groups, found in COB223 and COB227 respectively, appeared very efficient. The

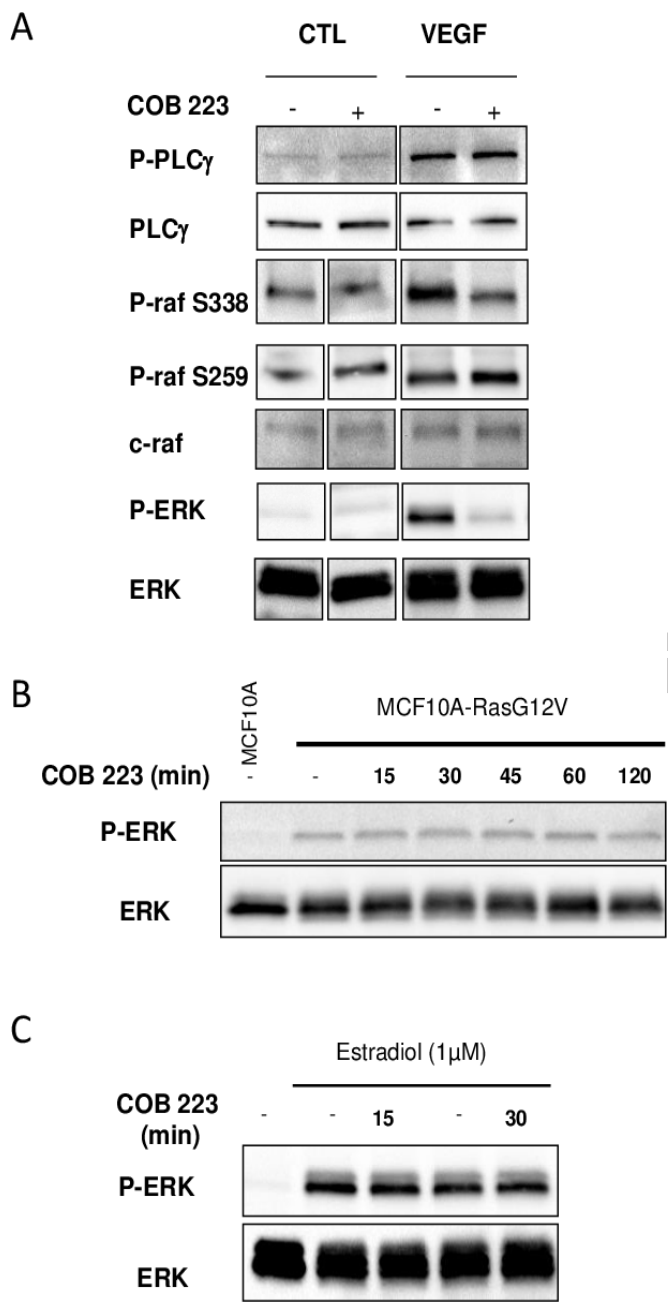


Fig. 5. Effect of COB223 on mitogenic or oncogenic activation of the Ras/MEK/ERK signaling pathway (A) Serum-starved HUVEC cells were incubated for 15 min in the presence of 10 ng/mL VEGF-A and in the absence or the presence of 25 μ M COB223. The phosphorylations of PLC γ on tyrosine 783, of Raf on serine 338 or on serine 259 and of ERK1/2 were then analyzed by Western blot analysis of the cell lysates as described in Material and Methods. Western blots for total PLC γ , Raf and ERK1/2 were used as loading controls. (B) MCF10A cells overexpressing an oncogenic version of Ras (MCF10A-RasG12V) were treated for the indicated periods of time by 25 μ M COB223. Total ERK1/2 and phospho-ERK1/2 were then visualized by Western blotting of the cell extracts. Non-treated regular MCF10A cells were analyzed as a control (first lane). (C) CCL-39 fibroblasts expressing a constitutively active Raf in an estrogen-responsive manner were stimulated for 3h with estradiol and treated for 15 or 30 min with 25 μ M COB223. Total ERK1/2 and phospho-ERK1/2 were then visualized by Western blotting of the cell extracts. Non-treated cells were analyzed as a control (left lanes).

presence of the diaminomethyl group on dansyl is critical for the activity of COB223 as shown by the lower efficiency of COB235

(IC₅₀ is 8 times higher than that of COB223). COB223 and COB227 contain a tert-butyloxycarbonyl function (BOC group) as a second hydrophobic group. Replacement of BOC by an amino group decreased the efficiency and the specificity (compare 05-102-L-B09 vs 05-06-L-D03, or COB227 vs COB228). We also tested the effect of two dansyl groups (05-06-L-F11, COB222, COB295). The molecules showed interesting properties but the lack of water solubility precluded further development. Replacing the amine-containing linker of COB223 by a diethylene glycol chain in COB296 did not modify the activity, thus confirming the major importance of the dansyl and BOC groups whereas the linking chain may be of various length and chemical nature.

As the screening was performed with GFP-expressing cell lines that might behave differently from the original cell line or from primary endothelial cells, we measured the dose-dependent effect of COB223 on native HMEC-1 and 3T3 cell lines as well as on primary dermal microvascular endothelial cells (HMVECd) (Fig. S2). COB223 appeared to be less active on HMEC and HMVECd (EC₅₀ = 50 μ M) than on HMEC-GFP (EC₅₀ = 5 μ M) but its preferential action on endothelial cells versus fibroblasts was still observed.

Anti-proliferative activity of COB223

Since angiogenesis results from stimulation of endothelial cell migration and cell proliferation, we then checked the effects of the leader compound COB223 on cell growth. As shown in Figure 1C and D, COB223 inhibited thymidine incorporation into both HMVECd and HUVEC endothelial cells at concentrations above 5 μ M. We also checked the effects of COB223 on 3T3 fibroblast and LLC/2 lung carcinoma cell proliferation (Figure 1E and F). Interestingly, COB223 appeared to have no effect on 3T3 cells (as already observed on cell migration) but inhibited LLC/2 cell proliferation although less efficiently than it did on endothelial cells. These effects were confirmed by cell cycle analysis using a FACS cytometer (data not shown).

In parallel, we evaluated the cytotoxicity of COB223 on these four cell lines by incubating confluent cells with various concentrations of this compound for 24h at 37°C (Fig. S3). It clearly appeared that COB223 was cytotoxic on all cell types at concentrations larger than 50 μ M. The major effects observed on endothelial cell proliferation and migration at 5 to 20 μ M are thus not attributable to any cytotoxic effect.

Confirmation of the anti-angiogenic activity of COB223 in vitro:

We then wished to establish that COB223 was still active in more biologically relevant *in vitro* angiogenesis assays, in particular in 3-dimensional assays that mimic endothelial sprouting in the extracellular matrix. We grew HMEC-GFP spheroids in collagen I gels in the absence or the presence of 10 ng/ml FGF-2 and either 10 or 20 μ M COB223 and we observed the spontaneous radial sprouting of endothelial cells after 96h of culture. As shown in Fig. S4A and B, 10 μ M COB223 inhibited both basal and FGF-2-stimulated sprouting by 50% and 70%, respectively.

We then used a second angiogenesis assay in which embryonic stem (ES) cells are allowed to differentiate toward the endothelial lineage and to subsequently sprout from pre-formed spheroids into a collagen-I gel (10). Endothelial sprouts can be visualized by CD31 immunostaining of *in toto* preparations (Fig. S5). Adding COB223 (12.5 μ M) to the collagen gel at day 6 clearly resulted in a complete inhibition of endothelial sprouting as shown in Fig. S5A and B.

COB223 inhibits angiogenesis in vivo:

We then checked whether the anti-angiogenic effect of COB223 could be observed *in vivo*. We used the mouse sponge assay in which a cellulose sponge is soaked with FGF-2, a potent pro-angiogenic factor, and subsequently implanted under the dorsal skin of mice. FGF-2 is then injected every other day through the skin into the sponge in the presence or absence of either COB223 or vehicle. After 7 days, the blood vessels and

capillaries that have grown from the skin towards the surface of the sponge can be visualized by non-invasive image analysis using the fluorescent marker RAFT-(RGDc)4 (also known as Angiostamp), as recently established (11). After imaging, the sponges can be recovered from sacrificed mice, photographed and the angiogenic response can be monitored by determination of the hemoglobin content of the homogenized sponges. As shown in Figure 2, both techniques conclusively showed a strong inhibition of the neovascular response to FGF-2 in the presence of COB223.

COB223 reduces tumor growth and microvessel formation:

Next, we used a murine xenograft tumor assay to determine the therapeutic potential of COB223. Nude mice were subcutaneously implanted with LLC/2 tumor cells and, once the tumor volume reached 50 mm³ (i.e. at day 7), were treated i.p. every other day either with 4 mg/kg or 16 mg/kg COB223 or with vehicle. Under COB treatment, we observed a similar decrease of tumor growth (32% to 38% reduction in tumor size at day 18 post-implantation) for both doses comparatively to mice treated with vehicle (Figure 3A). Although this inhibition is not drastic, it is interesting to note that the reduction in tumor size results from a decreased growth rate since the slope of the growth curve is reduced under COB223 treatment. Hematoxylin/eosin staining of COB-treated tumor sections revealed enlarged necrotic areas as compared to untreated tumors (Figure 3B). Quantification of this necrotic process indicated that 20% of untreated tumors versus 60% of COB-treated tumors presented necrotic areas larger than 15% of their surface (Figure 3C). In addition, we investigated tumor vascularization by CD31 immunostaining (Figure 3B). A significant decrease in the density and the size (luminal surface) of the microvessels was observed in the non-necrotic part of COB223-treated tumors, as quantified in Figure 3 D and E. This allowed us to speculate that the anti-tumoral effect of COB223 might be caused, at least in part, by its anti-angiogenic action. However, as we observed that COB223 reduces also the proliferation of tumor cells, we analyzed the proliferative status of control and COB223-treated tumors using two markers of cell division, phospho-ERK1/2 and phospho-histone H3 (Figure 3B). The number of positive cells for these two markers was significantly decreased in sections from COB223-treated tumors (Figure 3F).

As COB227 showed a better ratio of *in vitro* activity between endothelial cells and fibroblasts, we also checked its effects on *in vivo* LLC/2 tumor growth. We observed no inhibition of tumor growth and therefore stopped the development of this series of naphthalimide compounds, as this lack of effect probably reflected poor pharmacodynamic or pharmacokinetic properties.

Identification of COB223 mechanism of action :

We first wondered whether COB223 required to be internalized to exert its biological effect. For this, we synthesized a covalent complex between BSA and COB223 and purified it. Whereas COB223 (which can be visualized by its fluorescent dansyl group) was rapidly taken up and internalized in endothelial cells, COB223-BSA did not appear to enter these cells. Interestingly, COB223-BSA was also unable to inhibit wound closure in endothelial cells, indicating that its mode of action is intracellular. In agreement with this conclusion, we observed that binding of ¹²⁵I-VEGF-A₁₂₁ to HUVEC cells was unaffected by the presence of COB223 whereas it was efficiently displaced by unlabeled VEGF (data not shown). We then evaluated whether COB223 could act as a protein-kinase inhibitor, although its structure does not resemble those of ATP-competing inhibitors such as sorafenib or sunitinib. *In vitro* kinase assays were performed with a panel of purified protein-kinases involved in mitogenic signaling, including VEGFR2, FGFR1, FGFR2, PDGFR β , Met, Raf, MEK1, ERK1, ERK2, PKC α , PKC β _I, PKC β _{II}, PKC ζ as indicated in Table S2. None of them was inhibited by COB223

at concentrations up to 50 μ M. We then analyzed the effect of COB223 on VEGF-induced phosphorylations of VEGFR2, MEK and ERK1/2 (Figure 4). COB223 did not alter the autophosphorylation of VEGFR2 on tyrosine residues 1175 (this site mediating activation of the ERK pathway) and 1214 (this site mediating the activation of the p38 MAP kinase pathway) (12). In contrast, VEGF-induced phosphorylations of MEK and ERK1/2 were significantly inhibited in the presence of COB223. When FGF-2 or fetal calf serum were used as mitogenic activators of the MAP kinase pathway, we observed a similar inhibitory effect of COB223 on MEK and ERK1/2 (Figure 4). A detailed dose-response study indicated that inhibition of MAP kinase phosphorylation was detectable at a concentration of 5 μ M and was statistically significant at 20 μ M. This inhibition also appeared to be somehow cell-specific since COB223 did not affect FGF2-induced or serum-induced phosphorylation of ERK1/2 in 3T3 fibroblasts (data not shown). It was also specific of the p42/p44 MAP kinase pathway as activation of p38 MAP kinase phosphorylation in HUVEC cells by VEGF or serum was unaffected by COB223 (data not shown). The activation of src phosphorylation by VEGF in HUVECs was also unaffected by COB223 (data not shown).

One important step between the phosphorylation of growth factor receptors and the activation of ERK1/2 is the activation of Ras. Unlike most other receptor tyrosine kinases, VEGFR2 activates Ras, not via GRB2-SOS, but via phospho-Y1175-dependent phosphorylation of PLC γ and subsequent activation of protein kinases-C (PKCs) (13, 14). Although the exact mechanism of VEGFR2-induced Ras activation is still unclear, one proposed mechanism involves PKC-mediated activation of sphingosine kinase-1 (SPK1) (15). In agreement with these statements, we observed that chemical inhibitors of PKC (Gö6976+Gö6983), completely inhibited VEGF-induced ERK1/2 phosphorylation in HUVECs whereas they only partially inhibited FGF2-induced ERK1/2 phosphorylation (Fig. S6B). In the same assay, COB223 inhibited the phosphorylation of ERK1/2 induced by the PKC activator PMA (Fig. S6A), confirming that it is acting downstream of PKC. We then checked the phosphorylation of the upstream activator of MEK, namely Raf and of the downstream target of activated VEGFR2, namely PLC γ (Figure 5A). VEGF-induced tyrosine phosphorylation of PLC γ on residue Y783 was unaffected by COB223. In contrast, phosphorylation of Raf on residue S338 (the target of Ras activation) was inhibited in the presence of COB223 whereas Raf phosphorylation on residue S259 (a site reported as a direct target of PKA and Akt/PKB) was not. The same differential effect was observed on Raf phosphorylation when serum was used as a mitogenic stimulus (data not shown). We then attempted to measure the activation of Ras by using a pull-down assay in which the Ras-binding domain of Raf is used to catch and subsequently detect active Ras but we were unable to generate reproducible results. In order to circumvent this limitation, we checked the effect of COB223 on the phosphorylation of ERK1/2 induced by the constitutive expression of oncogenic Ras^{V12} in MCF-10A cells (S9B). COB223 did not modify this constitutive phosphorylation, suggesting that it is acting upstream of Ras. In agreement with this observation, COB223 did not inhibit ERK phosphorylation induced by estrogen in CCL-39 fibroblasts expressing a constitutively active Raf in an estrogen-responsive manner.

Discussion :

Anti-VEGF antibodies (Bevacizumab) and tyrosine kinase inhibitors (Sorafenib, Sunitinib, Pazopanib, ...) have proven some efficacy in the treatment of several metastatic cancers (16, 17). However, the frequent appearance of resistance to these anti-angiogenic therapies have tempered the initial enthusiasm (18). When resistance to a first line anti-angiogenic treatment emerges,

681 changing the class of anti-angiogenic molecules (e.g. from Be-
682 vacizumab to a tyrosine kinase inhibitor) results in prolonged
683 survival of the patients (19). New anti-angiogenic molecules,
684 acting through distinct mechanisms than the existing ones, are
685 thus urgently required for second or third line treatments of
686 angiogenic cancers.

687 In this work, we searched for such new anti-angiogenic
688 molecules by screening an academic chemical library (from
689 DCM, University Grenoble-Alpes, France) that contained origi-
690 nal, never-patented molecules. We could identify a family of
691 dansylated polyamines which showed marked cell specificity as
692 they inhibited more strongly endothelial cell than 3T3 fibroblast
693 migration and proliferation. The SAR study revealed that natural
694 or synthetic aliphatic polyamines such as spermine, putrescine,
695 diaminopropane or ethylenediamine were inactive and that both
696 chemical groups (dansyl and BOC) present at each extremity of the
697 leader compound COB223 were important. So far, no biological
698 activity for such compounds (or closely structural analogs) has
699 been described.

700 We wondered whether COB223 required to be internal-
701 ized to exert its anti-angiogenic action. The fluorescent
702 COB223 molecule is rapidly internalized by endothelial cells
703 in a temperature-dependent manner. Interestingly, uptake of
704 COB223 was less efficient in 3T3 fibroblasts and appeared to
705 correlate with the lesser biological activity of this compound
706 on 3T3 cell proliferation and migration. In agreement with an
707 intracellular site of action of COB223, we observed that coupling
708 COB223 to BSA (BSA is not cell-permeable) suppressed its
709 inhibitory effect on endothelial cell migration. In addition, we
710 observed no competition of COB223 with VEGF-A for its cell
711 surface receptors and no inhibition of VEGF-induced VEGFR2
712 tyrosine phosphorylation. Taken together, these observations sup-
713 port an intracellular mode of action for this molecule.

714 Careful and detailed analysis of the effects of COB223 on
715 the signaling pathway activated in endothelial cells by VEGF and
716 other endothelial mitogens such as FGF-2 and serum, led us to
717 the conclusions that COB223 acts downstream of the activated
718 growth factor receptors and upstream of activated Ras, Raf,
719 MEK and ERK1/2 (Fig. S7). Ras is a small G-protein acting
720 downstream of growth factor receptors. In quiescent cells, Ras
721 is bound to GDP and is inactive. Unlike most growth factors
722 which activate Ras through the adaptor proteins Grb2 and the
723 GDP/GTP exchange factor Sos, VEGF induces the recruitment
724 of the adaptor protein TSA_d (T cell-specific adaptor) and the
725 effector protein PLC γ onto the phosphorylated residues Y951
726 and Y1175 of activated VEGFR2, respectively (14, 20). Subse-
727 quent phosphorylation of PLC γ induces hydrolysis of the mem-
728 brane phospholipid phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate into
729 diacylglycerol and inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃), which, in
730 turn, activate the PKC isoforms PKC α , PKC β and PKC ζ (21, 22).
731 One relevant substrate of VEGF-activated PKCs is sphingosine
732 kinase 1 (SPK1), which converts sphingosine into sphingosine-1
733 phosphate (S1P). How S1P activates Ras is still an unanswered
734 question but it was reported that this occurred through activation
735 of GAPs (GTPase activating proteins) rather than through inhibi-
736 tion of GEFs (Guanine exchange factors) (15). In its GTP-bound
737 form, Ras recruits the protein kinase Raf at the plasma membrane
738 and subsequently activates MEK and ERK1/2 (p42/p44 MAPK).
739 As we observed that COB223 inhibits not only endothelial cell
740 migration but also cell proliferation, the inhibition of Ras acti-
741 vation would certainly be decisive for triggering cell proliferation
742 arrest. It was more surprising to us that COB223 did not affect the
743 activation of p38 MAPK as this pathway, which is also stimulated
744 by activated VEGF receptors, has been reported to trigger cell
745 migration through phosphorylation of heat-shock protein 27 (23)
746 and LIM kinase 1 (24). One possible explanation is that other
747 signaling pathways implicated in cell migration such as Rho-A or
748

749 Focal Adhesion Kinase (FAK) are affected downstream of Ras
750 inhibition (25). More detailed studies will be required to elucidate
751 these mechanisms.

752 Intraperitoneal administration of COB223 to LLC/2 tumor-
753 bearing mice resulted in a significant decrease the rate of tumor
754 growth, suggesting a direct anti-proliferative or pro-apoptotic
755 effect. No difference was observed between the two doses tested,
756 indicating that 4 mg/kg already produced a maximal effect. This
757 is a much lower dose than those routinely used with other chemi-
758 cal angiogenesis inhibitors in similar models: 30-60 mg/kg for
759 sorafenib or 50 mg/kg for sunitinib. Although the compound is
760 not yet optimized, this suggests that its bioavailability is excellent.
761 The intensity of fluorescence of the dansyl group of COB223
762 was unfortunately not sufficient to allow a detailed study of the
763 biodistribution of the molecule and would need further addition
764 of a radioactive or a more highly fluorescent tag. The tolerance
765 of the molecule appeared excellent as no adverse effect was
766 observed over a two week-long treatment with up to 16 mg/kg
767 COB223. The major effects observed in tumors from COB223-
768 treated mice were a decrease in the density and the size of the
769 tumoral microvessels and a marked increase in necrosis. As we
770 showed that COB223 is also cytostatic for LLC/2 tumor cells *in*
771 *vitro*, the observed antitumoral effects might result from both
772 an anti-angiogenic effect and a direct anti-proliferative effect
773 on tumor cells. COB223 appears to inhibit the growth factor-
774 induced Raf/MEK/ERK protein kinase cascade but to be unable
775 to inhibit the activation of these kinases by an oncogenic version
776 of Ras. It should therefore be efficient on tumor models bearing
777 an activated Ras pathway (due e.g. to growth factor receptor
778 overexpression) but inactive on those presenting oncogenic Ras
779 mutations. It is worth noting that, in Lewis lung carcinoma, Ras
780 is not mutated but is activated due to lack of p66Shc expression
781 (26).

782 Several targeted therapies that inhibit the Ras-Raf-MEK-
783 ERK pathway have been developed by pharmaceutical compa-
784 nies. The clinical performance of Ras farnesylation inhibitors has
785 remained disappointing (27). Several kinase inhibitors targeting
786 this pathway are also undergoing clinical trials. In this context,
787 COB223 appears as a promising leader compound targeting the
788 Ras pathway by a novel mechanism.

789 Acknowledgements:

790 We thank Dr B. Vailhé who initiated this research program. We are
791 indebted to Dr M. Thomas (BCI, Grenoble, France) for generously providing
792 us with GFP-expressing retroviruses. We thank Dr O. Filhol (BCI, Grenoble,
793 France) and Dr G. Pagès (IRCAN, Nice, France) for their generous gifts
794 of Ras^{V12}-expressing MCF10A and estrogen-inducible raf-expressing CCL-39
795 cells, respectively. We are indebted to S. Bouillot and M. Courçon (BCI,
796 Grenoble, France) for their generous gifts of primary HUVEC cultures. This
797 work was supported by CEA-DSV-IRTSV, Université Joseph Fourier (AGIR
798 2014), INSERM (U1036), Cancéropole Lyon-Auvergne-Rhône-Alpes (CLARA),
799 Ligue Départementale contre le Cancer de l'Isère, GEFLUC (Groupement des
800 Entreprises Françaises pour la Lutte contre le Cancer) and Labex ARCANE
801 (ANR-11-LABX-0003-01). DQ was supported by a post-doctoral grant from
802 CEA-DSV-IRTSV. **References**: 1. Bergers G & Benjamin LE (2003) Tumorigen-
803 esis and the angiogenic switch. *Nature Rev Cancer* 3(6):401-410. 2. Bridges
804 EM & Harris AL (2011) The angiogenic process as a therapeutic target in
805 cancer. *Biochem. Pharmacol.* 81(10):1183-1191. 3. Ferrara N & Kerbel RS
806 (2005) Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438(7070):967-974. 4.
807 Crawford Y & Ferrara N (2009) Tumor and stromal pathways mediating
808 refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. *Trends Pharmacol. Sci.*
809 30(12):624-630. 5. Swinney DC & Anthony J (2011) How were new medicines
810 discovered? *Nature Rev. Drug Discov* 10(7):507-519. 6. Vailhé B, Vittet D,
811 & Feige JJ (2001) In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab.*
812 *Invest.* 81(4):439-452. 7. Lenormand P, McMahon M, & Pouyssegur J (1996)
813 Oncogenic Raf-1 activates p70 S6 kinase via a mitogen-activated protein
814 kinase-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 271(26):15762-15768. 8. Ades
815 EW, et al. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvas-
816 cular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99(6):683-690. 9. Zhang JH,
817 Chung TD, & Oldenburg KR (1999) A Simple Statistical Parameter for Use in
818 Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J. Biomol*
819 *Screen* 4(2):67-73. 10. Hermant B, et al. (2007) Development of a one-step
820 embryonic stem cell-based assay for the screening of sprouting angiogenesis.
821 *BMC Biotechnol.* 7:20. 11. Keramidis M, Jossierand V, Feige JJ, & Coll JL

817 (2013) Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using
818 RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol Imaging Biol*
819 15(3):239-244. 12. Simons M (2012) An inside view: VEGF receptor trafficking
820 and signaling. *Physiology* 27(4):213-222. 13. Koch S & Claesson-Welsh L (2012)
821 Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold*
822 *Spring Harb Perspect Med* 2(7):a006502. 14. Takahashi T, Yamaguchi S, Chida
823 K, & Shibuya M (2001) A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is
824 essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis
825 in vascular endothelial cells. *EMBO J.* 20(11):2768-2778. 15. Shu X, Wu W,
826 Mosteller RD, & Broek D (2002) Sphingosine kinase mediates vascular en-
827 dothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated pro-
828 tein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 22(22):7758-7768. 16. Berz D & Wanebo H (2011)
829 Targeting the growth factors and angiogenesis pathways: small molecules in
830 solid tumors. *J. Surg. Oncol.* 103(6):574-586. 17. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber
831 HP, & Novotny W (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-
832 VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 3(5):391-400. 18.
833 Kerbel RS (1991) Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent
834 acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 13(1):31-36.
835 19. Khattak M & Larkin J (2014) Sequential therapy with targeted agents
836 in metastatic renal cell carcinoma: beyond second-line and overcoming
837 drug resistance. *World J. Urol.* 32(1):19-29. 20. Sun Z, et al. (2012) VEGFR2

induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor
protein TSA. *J. Exp. Med.* 209(7):1363-1377. 21. Wellner M, et al. (1999) The
proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein
kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler Thromb, Vascular Biol*
19(1):178-185. 22. Xia P, et al. (1996) Characterization of vascular endothelial
growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and
endothelial cell growth. *J. Clin. Invest.* 98(9):2018-2026. 23. Rousseau S, Houle
F, Landry J, & Huot J (1997) p38 MAP kinase activation by vascular endothelial
growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human
endothelial cells. *Oncogene* 15(18):2169-2177. 24. Kobayashi M, Nishita M,
Mishima T, Ohashi K, & Mizuno K (2006) MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase
activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration.
EMBO J. 25(4):713-726. 25. Kanda S, Miyata Y, & Kanetake H (2004) Role
of focal adhesion formation in migration and morphogenesis of endothelial
cells. *Cell. Signal.* 16(11):1273-1281. 26. Ma Z, Liu Z, Wu RF, & Terada LS (2010)
p66(Shc) restrains Ras hyperactivation and suppresses metastatic behavior.
Oncogene 29(41):5559-5567. 27. Caponigro F, Casale M, & Bryce J (2003)
Farnesyl transferase inhibitors in clinical development. *Expert Opin Investig*
Drugs 12(6):943-954.

885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952

Submission PDF

S1 : Supplementary Materials and Methods

Chemical synthesis of COB223 and analogs:

W7, monodansylcadaverine, 1,2-ethylenediamine, 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis).

General information:

Melting points were determined using a Reicher Thermovar apparatus and are uncorrected. NMR spectra were recorded on Bruker AM 300 and 400 spectrometers using solvent as the internal reference (DMSO-d₆ at 2.49 ppm, CDCl₃ at 7.24 ppm); the chemical shifts are reported in ppm, in δ units. Mass spectra were recorded on a Polarisq Thermo Finnigan spectrometer. Elemental analyses were performed at "Service de microanalyse, Université Joseph Fourier". Reversed-phase HPLC was performed with a μ -bondapak-C18 analytical column (Waters Associates). A Waters chromatographic system was used, with two M-510 pumps and a photodiode array detector Waters 996 using Millenium 32 software. A linear gradient from 0 to 100 % methanol in H₂O pH 2.5 (phosphoric acid), 2 mL/min flow rate, was used. All starting materials were commercially available

General procedure A:

Stoichiometric amount (0.65 mmol) of the acyl chloride and the alkylamine (RNH₂) were mixed together in dichloromethane (3 ml) and the resulting solution was stirred for 15 h at room temperature. Aqueous sodium carbonate solution (1M, 3 ml) was added and the resulting mixture was vigorously stirred for 1h and then let on standing to allow clean separation of the two layers.

The organic layer was decanted, washed several times with water, and finally with brine. The organic layer was dried on MgSO₄, filtered and evaporated to dryness under reduced pressure. Most of the newly synthesised molecules were isolated as oily residues.

The purity of the new compounds was checked by analytical hplc, and the structures confirmed by NMR analysis.

This procedure was performed with carboxylic acid chloride (benzoyl chloride), sulfonic acid chlorides (tosyl-, naphthalene sulfonyl and dansyl chlorides) or chloroformates. (para-nitrobenzyloxycarbonyl chloride).

General procedure B:

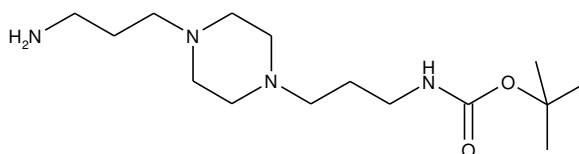
A mixture of the amine (1.5 eq.) and naphthalic anhydride (1 eq.) in EtOH was refluxed for 24h. The solvent was then evaporated and the residue was dissolved in the minimum amount of AcOEt. A large volume of Et₂O was added and the resulting solid was filtered off. The organic phase was evaporated to dryness to give the desired product.

General procedure C (Boc deprotection)

The Boc protected amines were dissolved in EtOH (2 ml) and 37% HCl (2 ml) was slowly added to the solution cooled in an ice-bath. The solution was then kept for 1h at rt and the solid that had formed was filtered off. To obtain the free base, the solid was

dissolved in the minimum amount of water and the solution was basified by slowly adding a saturated solution of NaHCO_3 until reaching pH 11. The aqueous solution was then extracted three times with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO_4 and evaporated.

tert-Butyl 3-(4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl) propylcarbamate **1**

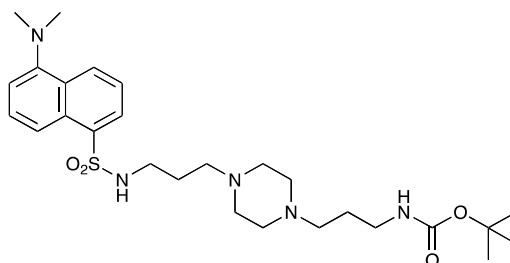


The 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine in large excess (4.5 ml, 21 mmol) was diluted with CHCl_3 (25 ml). A solution of Boc_2O (0.94 g, 4.3 mmol) diluted in CHCl_3 (25 ml) was slowly added to the polyamine solution cooled in an ice bath and vigorously stirred. The solution was stirred at rt overnight. The solution was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. Saturated NaCl aqueous solution (50 ml) was added to the resulting oil to precipitate the bis-Boc protected polyamine, that was filtered off and washed with NaCl solution. The aqueous phase was then extracted three times with Et_2O . The organic phase was then dried over MgSO_4 and evaporated to give **1** as an oily residue (700 mg, 2.33 mmol, 54% yield).

The $^1\text{H-NMR}$ spectrum was found identical to that of the commercial reagent.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 5.47 (s, 1H, NH), 3.13-3.19 (m, 2H, CH_2NBoc), 2.72-2.76 (m, 2H, CH_2NH_2), 2.35-2.45 (m, 4H), 1.58-1.67 (m, 4H), 1.41 (s, 9H, CH_3)

tert-Butyl 3-(4-(3-(5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)propyl)piperazin-1-yl) propylcarbamate; **COB223**



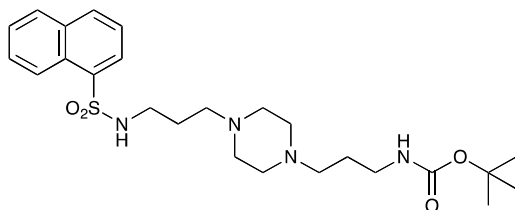
The 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine in large excess (3 ml, 14 mmol) was diluted with CH_2Cl_2 (120 ml). A solution of dansyl chloride (0.3 g, 1.15 mmol) diluted in CH_2Cl_2 (30 ml) was slowly added to the polyamine solution cooled in an ice bath and vigorously stirred. The solution was stirred at rt overnight. The solution was then extracted with aqueous 1M citric acid solution. The aqueous phase was separated and basified by adding concentrated

NaOH solution. Extraction of the basic solution with CH_2Cl_2 afforded the mono-dansyl polyamine after evaporation of the organic solvent (342 mg, 0.78 mmol, 71% yield).

The oily residue was diluted in CH_2Cl_2 (50 ml) and Boc_2O (0.21 g, 1 mmol) was added. The solution was stirred overnight, then washed once with 1N NaHCO_3 and twice with water. The organic phase was then dried over MgSO_4 and evaporated to give 267 mg of gummy residue that solidified upon standing (0.5 mmol, 64 % yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.51 (m, 1H), 8.31 (m, 1H), 8.23 (m, 1H), 7.47-7.53 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 5.35 (broad s, NH), 3.16-3.22 (m, 2H), 2.94 (m, 2H), 2.3-2.5 (broad m, 8H), 1.57-1.66 (m, 4H), 1.43 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 156.2, 152.1, 134.8, 130.2, 130.0, 129.8, 128.0, 123.3, 119.0, 115.1, 58.1, 56.7, 53.1, 45.5, 44.3, 40.0, 28.5, 26.4, 23.8

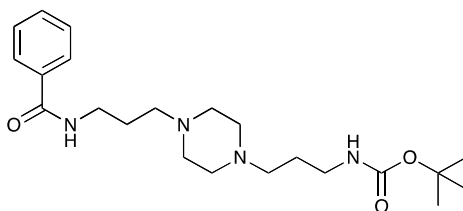
tert-Butyl 3-(4-(3-(naphthalene-1-sulfonamido)propyl)piperazin-1-yl)propylcarbamate; **COB235**



COB235 was prepared following method **A** from **1** (200 mg, 0.65 mmol) and naphthyl sulfonic chloride (147 mg, 0.65 mmol). **COB235** was isolated as an oil (239 mg, 75% yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.59-8.62 (m, 1H), 8.15-8.17 (m, 1H), 7.95-7.97 (m, 1H), 7.85-7.87 (m, 1H), 7.43-7.54 (m, 3H), 5.37 (broad s, 1H), 5.21 (broad s), 3.11-3.13, (m, 2H), 2.87 (m, 2H), 2.21-2.39 (broad m, 8H), 1.50-1.62 (m, 4H), 1.48 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 156.0, 134.6, 134.2, 133.9, 129.7, 129.1, 128.2, 127.9, 126.7, 124.5, 124.2, 57.8, 56.5, 53.0, 44.0, 39.7, 28.5, 26.4, 23.8

tert-Butyl 3-(4-(3-phenylamidopropyl)piperazin-1-yl)propylcarbamate; **COB237**

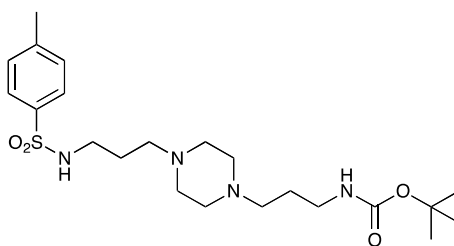


COB237 was prepared following method **A** from **1** (200 mg, 0.65 mmol) and benzoyl chloride (76 μl , 0.65 mmol). **COB237** was isolated as an oil (171 mg, 65% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 8.21 (broad s, 1H), 7.77-7.81 (m, 2H), 7.35-7.47 (m, 3H), 5.36 (broad s, 1H), 3.51 (m, 2H), 3.13 (m, 2H), 2.34-2.55 (m, 8H), 1.75 (m, 2H), 1.61 (m, 2H), 1.41 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 167.3, 156.0, 134.9, 131.2, 128.3, 127.1, 58.3, 56.8, 53.4, 53.1, 40.8, 39.7, 28.4, 26.4, 24.3

tert-Butyl
propylcarbamate; **COB236**

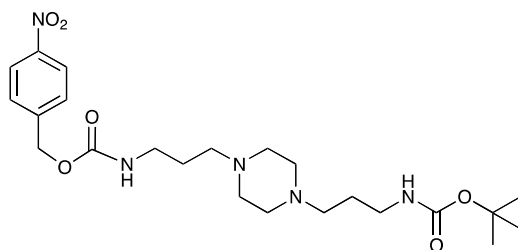
3-(4-(3-(4-methylphenylsulfonamido)propyl)piperazin-1-yl)



COB236 was prepared following method **A** from **1** (200 mg, 0.65 mmol) and para-toluene sulfonyl chloride (124 mg, 0.65 mmol). **COB236** was isolated as an oil (197 mg, 66% yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.71 (d, 2H), 7.28 (d, 2H), 5.4 (broad s, 1H), 3.14-3.20 (m, 2H), 3.03 (t, 2H), 2.36-2.44 (m, 13H), 1.56-1.68 (m, 4H), 1.42 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 156.1, 143.0, 137.2, 129.6, 127.0, 57.9, 56.5, 53.0, 44.1, 39.8, 28.4, 26.3, 24.0, 21.5

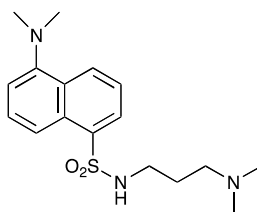
4-Nitrobenzyl N-[3-(4-{3-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propyl}piperazin-1-yl)propyl]carbamate; **COB238**



COB238 was prepared following method **A** from **1** (200 mg, 0.65 mmol) and 4-nitrobenzyl chloroformate (140 mg, 0.65 mmol). **COB238** was isolated as an oil (196 mg, 63% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.19 (d, 2H), 7.48 (d, 2H), 6.16 (broad s, NH), 5.36 (broad s, NH), 5.17 (s, 2H), 3.28 (quad, 2H), 3.13-3.19 (m, 2H), 2.37-2.46 (m, 8H), 1.59-1.72 (m, 4H), 1.42 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 156.2, 147.0, 144.5, 128.1, 127.1, 123.8, 64.9, 63.9, 57.1, 56.8, 53.2, 41.0, 39.9, 28.5, 26.4, 25.6

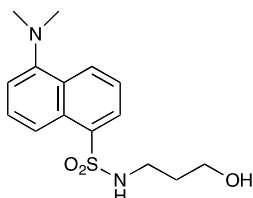
5-(Dimethylamino)-N-[3-(dimethylamino)propyl]naphthalene-1-sulfonamide; **COB221**



COB221 was prepared following method **A** from N,N-diaminopropylamine (314 μ l, 2.5 mmol) and dansyl chloride (270 mg, 1 mmol). **COB221** was isolated as an oil. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum was found identical to the literature data [Wang and Schneider, 1998].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.49-8.52 (m, 1H), 8.28-8.31 (m, 1H), 8.21-8.23 (m, 1H), 7.49-7.56 (m, 2H), 7.16 (d, 1H), 2.95 (t, 2H), 2.87 (s, 6H), 2.21 (t, 2H), 2.16 (t, 6H), 1.55 (quint, 2H)

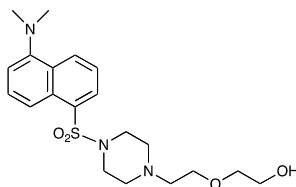
5-(Dimethylamino)-N-[3-hydroxypropyl]naphthalene-1-sulfonamide; **COB220**



COB220 was prepared following method **A** from 3-aminopropan-1-ol (0.19 ml, 2.5 mmol) and dansyl chloride (270 mg, 1 mmol). The $^1\text{H-NMR}$ spectrum was found identical to that of the commercial reagent.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.56 (d, 1H), 8.24-8.31 (m, 2H), 7.50-7.60 (m, 2H), 7.20 (d, 1H), 5.20 (m, 1H), 3.66 (broad m, 2H), 3.06 (quad, 2H), 2.80 (s, 6H), 1.64 (quint, 2H)

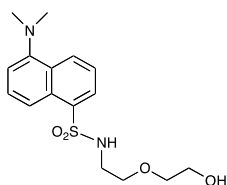
2-(2-[4-[5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl]piperazin-1-yl]ethoxy)ethan-1-ol; **COB224**



COB224 was prepared following method **A** from 2-[2-(1-piperazinyl)ethoxy]ethanol (0.5 ml, 2.9 mmol) and dansyl chloride (270 mg, 1 mmol). **COB237** was isolated as an oil (294 mg, 0.72 mmol, 72%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.55 (m, 1H), 8.41 (m, 1H), 8.17 (m, 1H), 7.48-7.54 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 3.49-3.62 (m, 6H), 3.22-3.25 (m, 4H), 2.87 (s, 6H), 2.53-2.57 (m, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 151.8, 132.8, 130.7, 130.6, 130.5, 130.2, 128.1, 123.2, 119.8, 115.3, 72.3, 67.8, 61.9, 57.5, 52.8, 45.5, 45.4

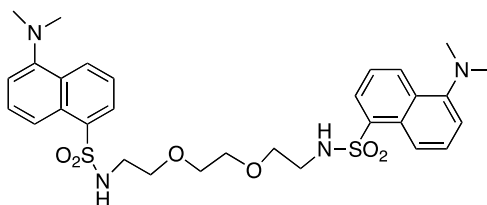
2-[2-[5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido]ethoxy]ethan-1-ol; **COB225**



COB225 was prepared following method **A** from 2-[2-aminoethoxy]ethanol (0.5 ml, 4.9 mmol) and dansyl chloride (270 mg, 1 mmol). **COB237** was isolated as an oil (239 mg, 0.70 mmol, 70 %)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.57 (d, 1H), 8.25-8.32 (m, 2H), 7.5-7.6 (m, 2H), 7.21 (d, 1H), 5.25 (m, 1H, NH), 3.57 (t, 2H), 3.39 (t, 2H), 3.31 (t, 2H), 3.13, (m, 2H), 2.91 (s, 6H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 1519, 135.1, 130.5, 129.9, 129.7, 129.5, 128.4, 123.4, 119.0, 114.4, 72.2, 69.2, 61.6, 45.5, 43.2

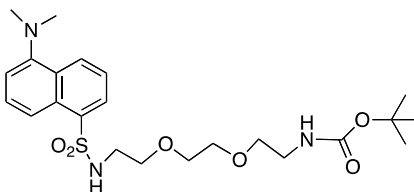
5-Dimethylamino-N-(2-[2-{2-(5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)ethoxy}ethoxy] ethyl)naphthalene-1-sulfonamide; **COB295**



COB295 was prepared by mixing dansyl chloride (278 mg, 1.03 mmol) and 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethan-1-amine (60 μl , 0.4 mmol) in dioxane (5 ml). The solution was stirred overnight at rt. The solvent was evaporated and the residue diluted with CH_2Cl_2 and pH 10 aqueous solution. The organic phase was separated, washed with water and brine, dried over MgSO_4 and the solvent was evaporated. **COB295** was obtained as an oil, (59 mg, 0.09 mmol, 24% yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.46 (m, 2H), 8.22 (m, 2H), 8.15 (m, 2H), 7.40-7.47 (m, 4H), 7.10 (m, 2H), 5.44 (br m, 2NH), 3.26-3.29 (m, 4H), 3.15 (m, 4H), 2.9-3.03 (m, 4H), 2.81 (s, 12H).

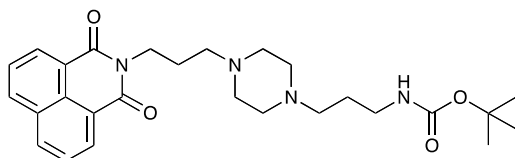
tert-Butyl N-(2-[2-{2-(5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)ethoxy}ethoxy]ethyl) carbamate; **COB296**



COB296 was prepared following the procedure reported in the literature from dansyl chloride (200 mg, 0.74 mmol) and N-8-*tert*-butoxycarbonylamine-3,6-dioxaoctylamine (227 mg, 0.91 mmol). **COB296** was obtained as a gum (191 mg, 0.39 mmol, 53% yield). The NMR data was identical to the literature data [Guy et al., 2007].

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.59-8.51 (m, 1H), 8.36-8.38 (m, 1H), 8.29-8.31 (m, 1H), 7.55-7.64 (m, 2H), 5.48 (br s, NH), 5.04 (br s, 1H), 3.15-3.54 (m, 10H), 3.15-3.19 (m, 2H), 2.29 (s, 6H), 1.48, (s, 9H)

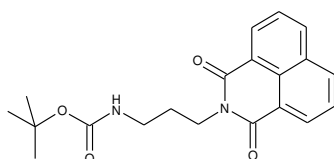
N-{3-[4-(3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl]piperazin-1-yl}propyl-1,8-naphthalimide; **COB227**



COB227 was obtained using General Procedure B from naphthalic anhydride (1 g, 5 mmol) and **1** (1.87 g, 6.25 mmol). **COB227** was isolated as a solid (2.05 g, 84% yield).

Mp 196-198°C; $^1\text{H-NMR}$ (300Hz, CDCl_3) : δ 8.60-8.63 (m, 2H), 8.21-8.24 (m, 2H), 7.75-7.80 (m, 2H), 5.44 (s, 1H, NH), 4.42-4.30 (m, 2H), 3.15-3.10 (m, 2H), 2.50-2.57 (m, 8H), 2.38-2.41 (m, 4H), 1.92-2.06 (m, 2H), 1.60-1.69 (m, 2H), 1.44 (s, 9H); $^{13}\text{C-N}$ (100Hz, CDCl_3): δ 164.4, 156.2, 134.0, 131.7, 131.2, 128.3, 127.0, 122.9, 56.9, 56.2, 53.1, 53.1, 40.1, 39.0, 28.5, 26.3, 25.1; MS : 481.3 [$M+H$]

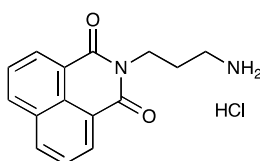
N-(3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl)-1,8-naphthalimide; **COB283**



COB283 was obtained using General Procedure B from naphthalic anhydride (99 mg, 0.5 mmol) and 3-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl amine (108 mg, 0.6 mmol). **COB283** was isolated as a solid (163 mg, 92% yield)

Mp 119-120°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) : δ 8.49 (m, 2H), 8.45 (m, 2H), 7.86 (m, 2H), 6.8 (br s, 1H, NH), 4.05 (t, 2H), 2.92 (m, 2H), 1.76 (quint, 2H), 1.35 (s, 9H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 164.6, 156.1, 134.1, 131.6, 131.4, 128.2, 127.1, 122.5, 38.1, 37.7, 28.6, 28.5; MS : 377.2 [$M+Na$]

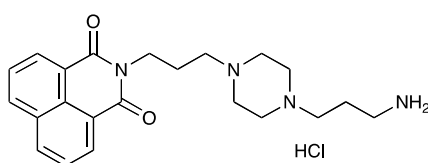
N-(3-Aminopropyl)-1,8-naphthalimide hydrochloride; **COB226**



COB226 was prepared from the corresponding tert-butoxycarbonyl (Boc) protected amine by hydrolysis following General Method C in agreement with a reported procedure [Kamal et al., 2003]. Yield: 85 %, of hygroscopic residue

Mp 298-299°C; ¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 8.49-8.52 (m, 2H), 7.96 (broad s), 8.46-8.49 (m, 2H), 7.86-7.91 (m, 2H), 4.10-4.15 (m, 2H), 2.79-3.04 (m, 2H), 1.94-2.03 (quint, 2H); ¹³C-NMR (CDCl₃, free base): δ 163.7, 134.3, 131.3, 130.7, 127.4, 127.2, 122.1, 37.0, 36.9, 25.9; MS : 255.1 [M+H], 277.1 [M+Na]

N-{3-[4-(3-Aminopropyl)piperazin-1-yl]propyl}-1,8-naphthalimide hydrochloride;
COB228

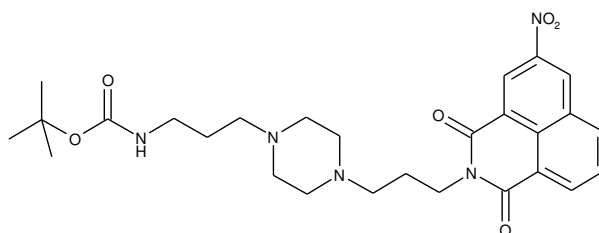


COB228 was obtained either from **COB227** following General Method C, or from naphthalic anhydride and a five fold excess of 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine following a reported procedure [Deady et al., 2000].

Hygroscopic solid.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 8.46-8.52 (m, 4H), 8.12 (broad s, 2H), 7.86-7.91 (m, 2H), 4.12-4.16 (t, 2H), 3.2-3.6 (broad m, 14H), 2.14-2.16 (m, 2H), 1.98-2.00 (m, 2H)

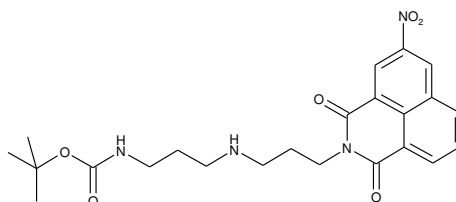
N-{3-[4-(3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl]piperazin-1-yl]propyl}-3-nitro-1,8-naphthalimide; **COB280**



COB280 was obtained using General Procedure B from 3-nitro-naphthalic anhydride (243 mg, 1 mmol) and **1** (373 mg, 1.2 mmol). **COB280** was isolated as an oil (480 mg, 93% Yield)

¹H-NMR (CDCl₃) : δ 9.3 (d, 1H, J 2.1Hz, Ar), 9.1 (d, 1H, J 2.1Hz, Ar), 8.77 (dd, 1H, J 0.9 and 4.8Hz), 8.43 (m, 1H), 7.94 (m, 1H), 5.42 (br s, 1H, NH), 4.27 (t, 2H), 3.14 (m, 2H), 2.35-2.53 (m, 8H), 2.28 (m, 4H), 1.96 (m, 2H), 1.58 (m, 2H), 1.42 (s, 9H, Boc); ¹³C-NMR (CDCl₃) : δ 163.2, 162.6, 156.1, 146.5, 135.6, 134.4, 131.1, 130.3, 129.2, 128.9, 124.9, 124.2, 123.4, 56.9, 56.1, 53.2, 46.2, 40.0, 39.5, 28.5, 26.4, 24.9; MS : 526.3 [M+H]

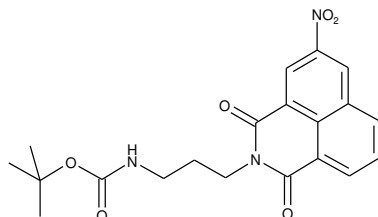
N-[3-((3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl)amino]propyl]-3-nitro-1,8-naphthalimide;
COB281



COB281 was obtained using General Procedure B from 3-nitro-naphthalic anhydride (243 mg, 1 mmol) and 3-[(3-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl)amino]propylamine (290 mg, 1.2 mmol). **COB281** was isolated as an oil (235 mg, 51% Yield)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 9.46 (s, 1H), 8.95 (d, 1H, J 2.28Hz), 8.77 (m, 1H), 8.67 (m, 1H), 8.05 (m, 1H), 6.74 (br s, 1H, NH), 4.21 (t, 2H), 2.93 (m, 2H), 2.44 (m, 2H), 1.77 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.35 (s, 9H, Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 163.3, 162.7, 156.3, 146.5, 135.7, 134.6, 131.1, 130.3, 129.3, 124.7, 124.4, 123.2, 53.8, 47.4, 47.0, 39.0, 38.8, 29.8, 28.5, 28.1; MS : 457.3[M+H]

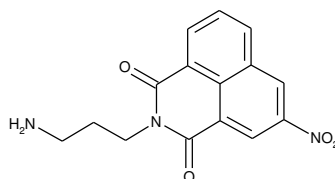
N-(3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl)-3-nitro-1,8-naphthalimide; **COB282**



COB282 was obtained using General Procedure B from 3-nitro-naphthalic anhydride (121 mg, 0.5 mmol) and 3-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)propylamine (108 mg, 0.62 mmol). **COB282** was isolated as a solid (137 mg, 68% Yield)

Mp 140-141°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 9.46 (d, 1H, J 2.4Hz), 8.94 (d, 1H, J 1.8Hz), 8.77 (m, 1H), 8.67 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.82 (br s, 1H, NH), 4.06 (t, 2H), 3.03 (quat, 2H), 1.78 (m, 2H), 1.36 (s, 9H, Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 163.3, 162.8, 155.9, 146.4, 135.7, 134.6, 131.0, 130.2, 129.1, 124.4, 124.2, 123.4, 38.1, 37.6, 28.4, 28.4; MS : 422.2 [M+Na]

N-(3-Aminopropyl)-3-nitro-1,8-naphthalimide hydrochloride **COB277**

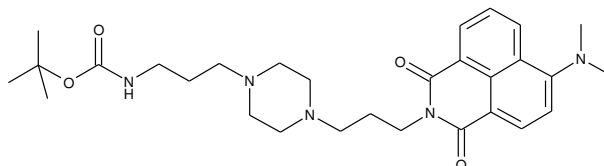


COB277 was prepared from the corresponding *tert*-butoxycarbonyl (Boc) substituted **COB282** following General Method C. Yield: 88 %, of hydroscopic residue

Mp 263-265°C

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 9.48 (d, 1H, J 2.3Hz), 8.94 (d, 1H, J 2.3Hz), 8.77 (dd, 1H, J 0.8 and 8.4), 8.68 (dd, 1H, J 1.1 and 7.3), 8.06 (m, 1H), 4.13 (t, 2H), 2.87 (m, 2H), 1.98 (m, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 163.0, 162.5, 145.8, 136.3, 133.8, 130.8, 129.6, 129.6, 129.2, 124.1, 122.7, 122.6, 37.4, 36.9, 25.8; MS : 300.1[$M+\text{Na}$]

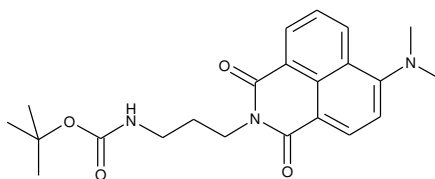
N-{3-[4-(3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl]piperazin-1-yl}propyl}-4-dimethylamino-1,8-naphthalimide; **COB274**



COB274 was obtained using General Procedure B from 4-dimethylamino-naphthalic anhydride (80 mg, 0.33 mmol) and **1** (132 mg, 0.4 mmol). **COB274** was isolated as an oil (170 mg, 98% yield)

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 8.51 (dd, 1H, J 1.05 and 8.52Hz, Ar), 8.43 (dd, 1H, J 0.99 and 7.29Hz), 8.34 (d, 1H), 7.75 (quat, 1H, J 1.05 and 7.87Hz), 7.21 (m, 1H), 6.76 (s, 1H, NH), 4.06 (m, 2H), 3.31-3.46 (m, 8H), 3.08 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.94 (m, 2H), 2.55 (m, 4H), 1.75 (quint, 2H), 1.51 (quint, 2H), 1.34 (s, 9H, Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 164.6, 164.1, 156.9, 156.1, 132.5, 131.1, 130.6, 125.3, 124.9, 123.2, 115.1, 113.3, 56.7, 56.0, 53.0, 52.8, 44.7, 39.8, 38.6, 28.4, 26.0, 24.0; MS : 524.4[$M+\text{H}$]

N-(3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl)-4-dimethylamino-1,8-naphthalimide; **COB276**

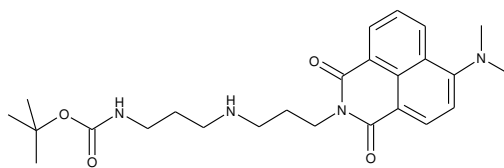


COB276 was obtained using General Procedure B from 4-dimethylamino-naphthalic anhydride (80 mg, 0.33 mmol) and 3-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)propylamine (82 mg, 0.4 mmol). **COB276** was isolated as a solid (130 mg, 99% Yield).

Mp 129-132°C; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) : δ 8.57 (dd, 1H, J 0.99 and 7.26 Hz), 8.48 (m, 1H), 8.44 (m, 1H), 7.67 (m, 1H), 7.13 (m, 1H), 4.26 (t, 2H), 3.16 (m, 2H), 3.12 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 1.90 (quint, 2H), 1.45 (s, 9H, Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 165.0, 164.5, 157.2, 156.1, 132.9, 131.5, 131.3, 130.4, 125.4, 125.0, 123.0, 114.8, 113.4, 53.5, 44.9, 37.4, 28.6, 28.6

MS : 398.2 [$M+\text{H}$], 420.2 [$M+\text{Na}$]

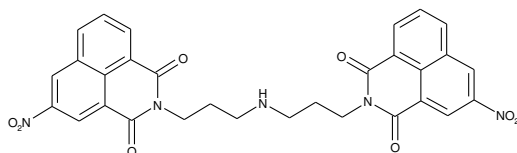
N-[3-((3-*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl)amino)propyl]-4-dimethylamino-1,8-naphthalimide; **COB275**



COB275 was obtained using General Procedure B from 4-dimethylamino-naphthalic anhydride (169 mg, 0.7 mmol) and 3-[(3-(*N*-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl)amino]propylamine (243 mg, 1 mmol). **COB275** was isolated as an oil (295 mg, 92% Yield).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 8.58 (dd, 1H, J 1.1 and 7.17 Hz), 8.48 (d, 1H), 8.42 (dd, 1H, J 1.14 and 7.98 Hz), 7.67 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.45 (s, 1H, NH), 4.29 (t, 2H), 3.29 (quat, 2H), 3.12 (s, 6H, $2\times\text{CH}_3$), 2.81 (m, 4H), 2.15 (quint, 2H), 1.85 (quint, 2H), 1.43 (s, 9H, Boc); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) : δ 165.1, 164.6, 157.4, 156.1, 133.2, 131.7, 131.5, 130.5, 125.2, 125.0, 12.8, 114.3, 113.4, 46.6, 46.4, 44.8, 38.2, 37.5, 28.6; MS : 455.3 [$M+H$]

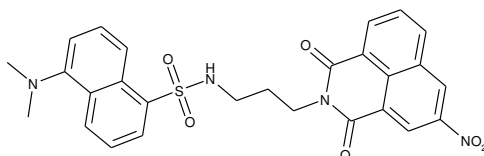
Bis-[(3-nitro-1,8-naphthalimido)propyl]amine; **COB278**



COB278 was prepared from a mixture of 3-nitro-naphthalic anhydride (304 mg, 1.2 mmol) and 1,3-bis(3-aminopropyl)amine (140 μl , 1 mmol) in dioxane (5 ml). The solution was stirred overnight at rt. The solvent was then evaporated to dryness and the residue was solubilized in a mixture of water and CH_2Cl_2 . The organic phase was washed several time with water, brine and then dried. Evaporation of the solvent gave the desired compound as a gum (266 mg, 72% yield).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6) : δ 9.4 (d, 2H, J 2.2Hz), 8.94 (d, 2H, J 2.3Hz), 8.72 (m, 2H), 8.62 (dd, 2H, J 1.0 and 7.3Hz), 8.01 (m, 2H), 4.07 (t, 4H), 2.59 (t, 4H), 1.75 (quint, 4H); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO-d_6) : δ 162.6, 162.0, 145.6, 136.1, 133.7, 130.6, 129.4, 129.3, 129.1, 123.8, 122.6, 122.4, 46.7, 38.5, 27.5; MS : 582.2 [$M+H$], 604.2 [$M+Na$]

N-[3-(5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)propyl]-4-dimethylamino-1,8-naphthalimide; **COB279**

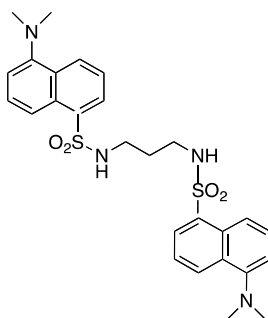


COB279 was obtained using General Procedure A from **COB277** (50 mg, 0.14 mmol) and dansyl chloride (50 mg, 0.18 mmol). After purification on alumina column chromatography, **COB279** was obtained as a gum (20 mg, 23%).

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): δ 9.17 (d, 1H, J 2.2 Hz), 9.10 (d, 1H, J 2.1 Hz), 8.67-8.70 (dd, 1H, J 1.1 and 7.3 Hz), 8.46-8.49 (m, 1H), 8.39-8.42 (dd, 1H, J 0.8 and J 8.2 Hz), 8.38, 8.40 (m, 1H), 8.20-8.23 (dd, 1H, J 1.2 and 7.2 Hz), 7.89-7.94 (m, 1H), 7.61-7.67 (m, 1H), 7.44-7.49 (m, 1H), 7.17-7.19 (m, 1H), 5.75-5.79 (br s, 1H, NH), 4.12-4.16 (t, 2H), 2.88-2.94 (m, 2H), 2.85 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1.82-1.86 (quint, 2H); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3): 163.5, 163.0, 151.9, 146.3, 135.9, 135.2, 134.8, 131.0, 130.3, 130.1, 129.9, 129.6, 129.5, 129.3, 128.4, 124.5, 124.2, 123.2, 122.8, 119.0, 115.2, 45.4, 40.1, 37.6, 38.2; MS : 533.2 [$M+H$]

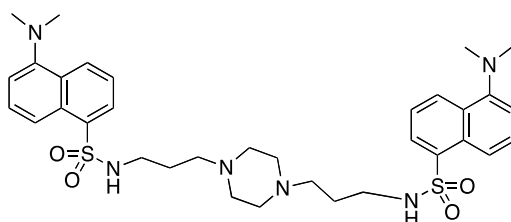
1,3-bis [5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido] diaminopropane **05-06-L-F11**

This compound was prepared from diaminopropane and an excess of dansyl chloride.



Solid, mp 90°C; $^1\text{H-NMR}$ (200Hz, CDCl_3): δ 8.40-7.00 (m, 12H), 4.80 (t, 2H), 2.80 (m, 16H), 1.35 (quint, 2H), $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ 130.4, 129.4, 128.5, 123.1, 118.4, 115.2, 45.3, 39.6, 29.7; MS: m/z 540 (M^+). Microanalysis calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ C 59.98, H 5.96, N 10.36; Found C 60.03, H 6.03, N 10.03

1,4-bis[3-(5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)propylamino]piperazine;
COB222

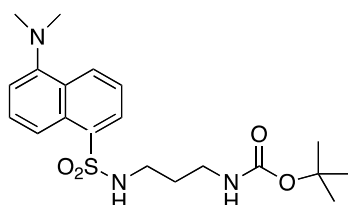


COB222 was prepared according to published procedure from a mixture of dansyl chloride (270 mg, 1 mmol) and 1,4-bis(3-aminopropyl)piperazine (82 μl , 0.4 mmol) in dioxane (5 ml). The solution was stirred overnight at rt. The solvent was then evaporated to dryness and the residue was solubilized in a mixture of 2N HCl and CH_2Cl_2 . The organic

phase was removed and the aqueous phase was basified to allow precipitation of **COB222**. The ^1H NMR spectrum was identical to literature data [Wang and Schneider, 1998].

^1H -NMR (CDCl_3) : δ 8.48 (d, 2H), 8.30 (d, 2H), 8.11 (d, 2H), 7.90 (s, 2H), 7.60 (m, 4H), 7.28 (m, 2H), 2.85 (s, 12H), 2.80 (m, 4H), 2.05 (broad m, 12H), 1.35 (m, 4H).

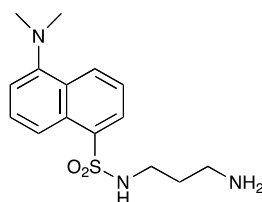
N-(5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamino-propane; **05-102-L-B09**



05-102-L-B09 was prepared as described previously [Boturyn et al., 1997].

^1H -NMR (200Hz CDCl_3) : δ 8.50 (d, 1H), 8.30 (d, 1H), 8.20 (d, 1H), 7.50 (m, 2H), 7.20 (d, 1H), 5.70 (br t, 1H), 4.50 (br t, 1H), 2.85 (s, 6H), 3.05 and 2.90 (2m, 4H), 1.50 (m, 2H), 1.35 (s, 9H).

N-(5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonamido)-1,3-diamino-propane; **05-06-L-D03**

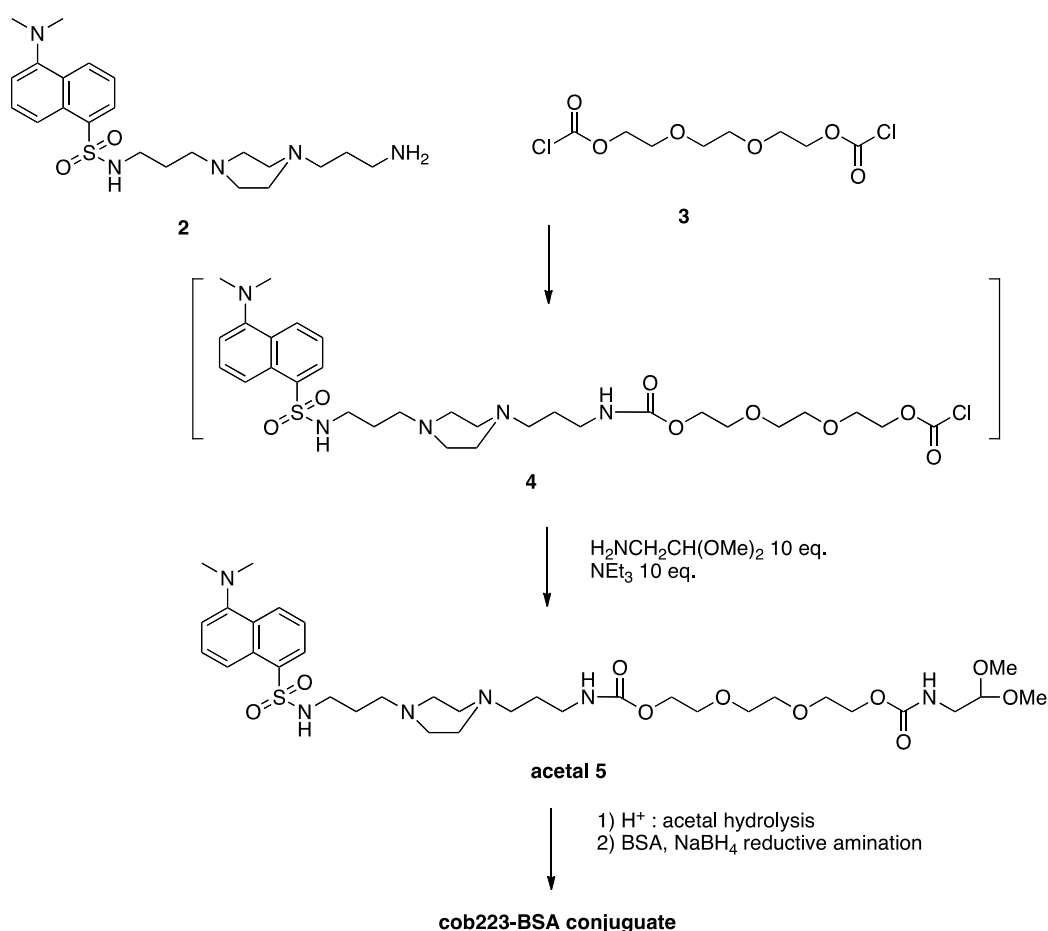


05-06-L-D03 was prepared as described previously [Boturyn et al., 1997].

^1H -NMR (200Hz CDCl_3) : δ 8.50 – 7.00 (m, 6H), 3.80 (broad m, 3H), 2.95-2.60 (m, 10H), 1.40 (q, 2H)

COB223-BSA conjugate.

The conjugate was obtained following the route described in the following scheme.



The mono-dansyl polyamine **2** (303 mg, 0.65 mmol), prepared as described above for **COB223**, (303 mg, 0.65 mmol) was solubilized in CH₂Cl₂ (20 ml) and slowly added to a solution of triethylene glycol bischloroformate **3** (1.3 ml, 6.5 mmol) in CH₂Cl₂ (200 ml) cooled to 0°C. The solution was stirred at rt for 30 min. Aminoacetaldehyde dimethyl acetal (1.4 ml, 13 mmol) and NEt₃ (1.8 ml, 13 mmol) were then added and to the resulting mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction was followed by TLC (silica gel, elution: MeOH) Diluted citric acid aqueous solution was then added to the organic solution. The water phase was separated, basified to pH 10 and extracted with CH₂Cl₂. The organic phase was washed with water and brine, dried over MgSO₄ and evaporated. The fluorescent yellow oil (345 mg) thus obtained was analyzed by NMR and used in the BSA conjugation step without any further purification.

5. ¹H NMR (CDCl₃) δ 8.57-8.60 (m, 1H), 8.35-8.37 (m, 1H), 8.27-8.29 (m, 1H), 7.57-7.59 (m, 3H), 7.21-7.24 (m, 1H), 5.7 (broad s), 5.15-5.21 (broad s), 4.43 (t, 1H, CH acetal), 4.26 (broad s, 4H), 3.67-3.78 (m, 8H), 3.43 (s, 6H, 2xOCH₃), 3.29-3.36 (m, 4H), 3.01 (m, 2H), 2.94 (s, 6H, 2xNCH₃), 2.50-2.94 (broad m, 10H), 1.50-1.62 (m, 4H)

The COB-acetal **5** (300 mg, 0.40 mmol) was diluted in aqueous 0.01M HCl (6 ml) and the pH value was adjusted to 2 by adding 1N HCl. The reaction was carried out at 20°C. The presence of the free aldehyde was checked by mixing a small aliquot of the reaction mixture

to a 2,4-dinitrophenylhydrazine aqueous solution (20 mg in 5 mL). The formation of the corresponding 2,4-dinitrophenylhydrazone was evidenced as a new spot on the TLC (elution: MeOH).

An aliquot of the reaction mixture (300 μ l, 0.08 mmol) was mixed with BSA (20 mg, 3.10^{-7} mol) in 2 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) at room temperature. Every 2h, 50 ml of a freshly prepared NaBH_3CN aqueous solution consisting of 10 mg (0.26 mmol) dissolved in 360 ml of phosphate buffer (0.1 M, pH 7) was added to the vial. After the third addition, the solution was kept overnight at 4°C. The solution was then chromatographed through Sephadex G25 column eluted with neat water. The presence of dansyl in the fractions corresponding to the protein was checked by fluorescence (UV illumination at 365 nm) and aliquots of 10 ml were mixed with 10 ml of loading buffer (100 mM Tris-Cl, 4%SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol, 200 mM dithiothreitol), denatured by heating at 90°C for 10 min and then analyzed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The fluorescent staining of the bands corresponding to BSA confirmed the covalent bonding of COB derivative. Fractions containing exclusively the BSA-COB conjugate were pooled and filtered through 0.22 μ m filter affording 4 μ mol of BSA-COB conjugate (based on dansyl absorbance, $\epsilon = 4200$ at 334 nm).

Preparation of green fluorescent cell lines

HMEC-1 or NIH-3T3 cells were infected by a defective retrovirus coding for the enhanced green fluorescent protein (EGFP). A construct containing EGFP under the control of herpetic human cytomegalovirus (HCMV) promoter, and neo gene (vector pEGFP-N1, Clontech, St Germain-en-Laye, France), was subcloned in the pLNCX vector. This construct was introduced in PT67 cells by transfection with Effectene (Qiagen, Hilden, Germany). The supernatant of PT67 cells was filtrated to collect viral particles, in order to infect HMEC-1 and 3T3 cells. Neomycin-resistant clones expressing EGFP were isolated by limit dilution and amplified as independent cell lines. These cell lines stably expressing EGFP were named HMEC-GFP and 3T3-GFP.

Scratch assay

Confluent cell monolayers were wounded with a plastic pipet tip, washed gently with phosphate buffer saline (PBS) and treated with complete media containing molecules, as indicated. Cells were placed at 37°C into the incubator and photographed at indicated times. Quantitation of closure of the monolayer was performed using the NIH Image J program (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Results are expressed as percentage of wound closure at t=24h as compared to the initial wound at t=0h.

Cell proliferation

Cells were treated with molecules in complete medium. After 22h, 1 μ Ci per well H^3 thymidine was added for 2 hours. Cells are then fixed by 10% trichloroacetic acid and harvested with 0.2N NaOH, 1% SDS. Radioactivity was measured in a beta counter.

Cell viability

Cells were grown in medium with 0.5% FCS (LLC/2 and 3T3 cells) or 2.5% FCS (HUVEC and HMVEC-d cells) in presence of COB223 at different concentrations for 24 hours. WST-1

assay (Roche Diagnostic, Meylan, France) was then performed according to the manufacturer's instructions.

Sprouting of HMEC-GFP

To prepare spheroids, HMEC-GFP cells were seeded at 3000 cells/well in round-bottom 96-multiwell plates in DMEM 1 g/L glucose (Eurobio, Les Ulis, France) containing 0.25 % methylcellulose. 48 h later, the spheroids were collected, transferred into flat-bottom 96-well plates and embedded in collagen gel (1.2 mg/mL type I collagen) prepared in a Iscove's modified Dulbecco's medium, supplemented with FGF-2 (10 ng/mL), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. Treatment with COB223 (10 and 20 µM) started right after spheroids were included in the collagen gels. Sprouting was allowed for 24 h at 37°C. Images were acquired by fluorescence microscopy and analysis of gel invasion was performed using the freeware Image J. Statistical analysis was performed using a Kruskal & Wallis test.

Invasion of HMEC-GFP spheroids in collagen matrix

HMEC-GFP cells were developed as spheroids in an Iscove's modified Dulbecco's medium containing 0.2 % methylcellulose in round-bottom 96-multiwell plate. Two days later, spheroids were collected and invasion was allowed in a Iscove's modified Dulbecco's medium, supplemented with 1.2 mg/mL collagen I, 50 U/mL Penicillin, 50 µg/mL streptomycin. Molecules (10 or 20 µM) or FGF-2 (10 ng/mL) were added in the preparation before collagen gelification.

Embryonic stem cells (ESC) differentiation into endothelial lineage

CJ7 cells (1000 cells/well; 12-well plates) were allowed to differentiate in collagen gels in Iscove's medium containing Glutamax (Iscove's modified Dulbecco's medium; Invitrogen) supplemented with 1.2 mg/mL collagen I (BD Biosciences, Bedford, MA), 15% fetal calf serum (Invitrogen), 450 µM monothioglycerol (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL insulin (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 50 U/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin (Invitrogen), as previously described [Feraud and Vittet, 2003]. A cocktail of growth factors was also added containing 50 ng/mL human VEGF-A (AbCys) and 100 ng/mL human FGF-2 (a generous gift from Dr. A. Baird, Whittier Institute, La Jolla, CA). At day 6, molecules were added with a novel addition of 50 ng/mL human VEGF-A and 100 ng/mL human FGF-2. Differentiation was allowed during 11 days.

Immunocytochemistry of embryoid bodies (EBs)

Collagen gels containing EBs were dehydrated and fixed in 4% paraformaldehyde during 15 min at room temperature. EBs were incubated for 1h with a rat monoclonal anti-mouse platelet/endothelial cell adhesion molecule (PECAM)/CD31 antibody (clone MEC-13.3, a gift from Dr A. Vecchi, Milano, Italy) as previously described [Vittet et al., 1997], followed by a 40 min incubation with a cyanine-3-labeled donkey anti-rat Ig antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). EBs were then mounted before examination under an epifluorescence microscope. For quantitation of endothelial sprouting, images were captured with a digital camera and measurement of the total length of endothelial sprouts was achieved by morphometric analysis using ImageJ software.

Ethics statement

Mice were housed under conventional conditions in the animal care facility at the Commissariat à l'Energie Atomique et aux Energies Alternatives. All experimental procedures were conducted according to the institutional guidelines and those formulated by the European Community for the Use of Experimental Animals. The animal protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Commissariat à l'Energie Atomique.

Mouse sponge angiogenesis assay

Disc Cellspan cellulose sponges (thickness 2 mm, diameter 10 mm, Cellomeda; Turku, Finland) were implanted under the skin of Balb-c mice under general anesthesia. Mice were divided in three groups receiving either DMSO, FGF-2, or FGF-2 and COB223 (groups of respectively 6, 7 and 8 mice). The sponges were hydrated with 50 μ L of PBS and 1.25% DMSO (vehicle of COB223), or FGF-2 (200 ng) or a mixture of FGF-2 (200 ng) and COB223 (100 μ M). DMSO, FGF-2 and/or COB223 (50 μ L) were injected again into the sponges through the skin on day 1 and 2. A third injection of COB223 alone was performed on day 4. On day 7, the vascularization of the sponges was imaged by non-invasive fluorescence imaging after i.p. injection of RAFT-(cRGD)₄ (Angiostamp, Fluoptics, Grenoble, France) as described in [Keramidas et al., 2013b]. The mice were then anesthetized and sacrificed by cervical dislocation on day 7 and the sponges were rapidly excised and photographed. Each sponge was then homogenized in 1 mL RIPA lysis buffer and the supernatants were used for quantification. The extent of vascularization of the sponge implants was assessed by measuring the amount of hemoglobin using the Drabkin's reagent (Sigma).

Mouse LLC-tumor model

We chose this model because of its rapid growth in syngenic mice and its strong dependence on angiogenesis. LLC/2 cells (10^6 in 50 μ L medium) were subcutaneously injected into the right flank of nude mice. Seven days after tumor inoculation, mice were given an intraperitoneal (i.p.) injection of either solvent (1.7 % DMSO) or COB223 every other day. Tumor size was measured with calipers, and the volume was calculated according to the formula $(L \cdot w^2)/2$ where L and h stand for length and width respectively. All mice were killed 21 days after tumor grafting.

Immunohistochemistry

Tumors collected after animal sacrifice were split into two parts and fixed either in 4% paraformaldehyde (v/v) or in formalin fixative for 24h at 4°C and embedded in paraffin and then cut into 7 μ m sections. Sections were stained using specific antibodies and the avidin–biotin immunoperoxidase detection method. Endogenous peroxidase activity was quenched by pretreatment with 3% (v/v) hydrogen peroxide in methanol for 20 min. For endothelial immunohistochemistry detection, CD31 antibody (MEC13.3, BD Pharmingen) was incubated for 2h at room temperature. The tissue sections were subsequently washed three times with PBS and incubated with biotinylated rabbit anti-rat IgG (1:250 dilution in blocking solution; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 1 h at room temperature. After three PBS washes, the slides were incubated with an avidin: biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 45 minutes. After a final PBS wash, the immunoreactive proteins were visualized after the addition of 3,3'-

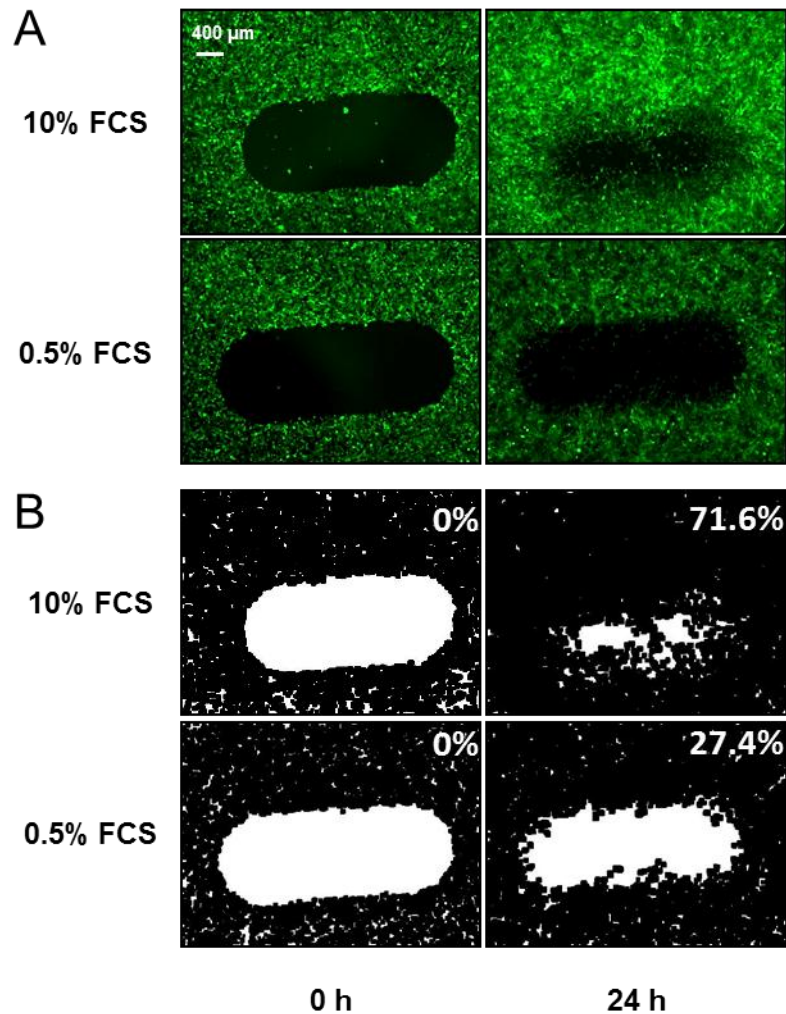
diaminobenzidine (Dako, Trappes, France) for 2 min and then counterstained with hematoxylin. Control sections were treated without primary antibody.

Western-blotting

Serum-starved HUVEC cells were incubated for 15 min in the presence of either 10 ng/mL VEGF-A or 20 ng/mL FGF-2 and in the absence or the presence of indicated concentration of COB223. COB223 was incubated 15 min prior to stimulation. Cells were lysed in RIPA buffer (Tris HCl pH 7.4 10 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, Na Deoxycholate 0.5%, EDTA 1 mM, Triton X100 1% and protease inhibitor cocktail (Sigma) for protein extraction. After fractionation of proteins on a 4-15% SDS-PAGE gel and blotting to a nitrocellulose membrane, immunoblotting detection of proteins was done using indicated antibodies according to manufacturer's instruction.

References:

1. Wang X & Schneider H-J (1998) Binding of dansylamide [dagger] derivatives to nucleotides and nucleic acids 1. *J Chem Soc Perkin Trans 2* (6):1323-1328.
2. Guy J, *et al.* (2007) Convergent preparation and photophysical characterization of dimaleimide dansyl fluorogens: elucidation of the maleimide fluorescence quenching mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* 129(39):11969-11977.
3. Kamal A, Srinivas O, Ramulu P, Ramesh G, & Kumar PP (2003) Synthesis of novel C2 and C2-C8 linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-naphthalimide hybrids as DNA-binding agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13(20):3577-3581.
4. Deady LW, *et al.* (2000) Synthesis and antitumor activity of some indeno[1,2-b]quinoline-based bis carboxamides. *Bioorg Med Chem* 8(5):977-984.
5. Boturyn D, Boudali A, Constant J-F, Defrancq E, & Lhomme J (1997) Synthesis of fluorescent probes for the detection of abasic sites in DNA. *Tetrahedron* 53(15):5485-5492.
6. Feraud O & Vittet D (2003) Murine embryonic stem cell in vitro differentiation: applications to the study of vascular development. *Histol. Histopathol.* 18(1):191-199.
7. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, & Huber P (1997) Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(12):6273-6278.
8. Keramidas M, Josserand V, Feige JJ, & Coll JL (2013) Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using RGD-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol Imaging Biol* 15(3):239-244.



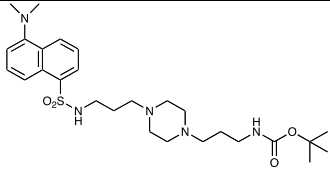
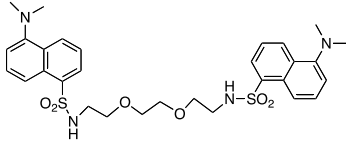
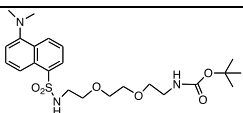
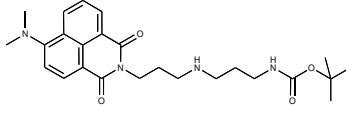
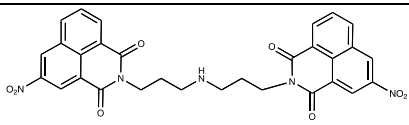
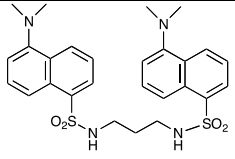
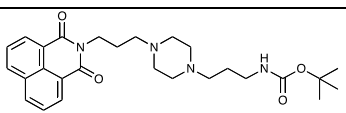
S2

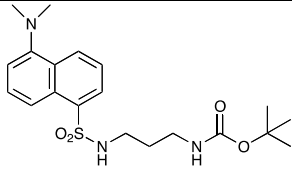
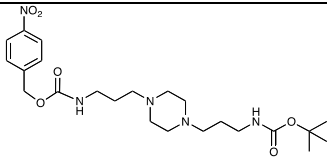
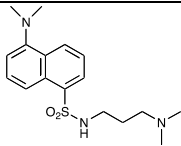
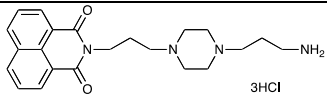
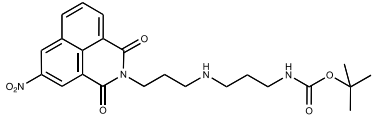
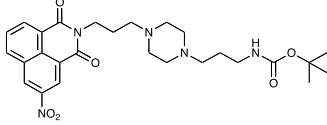
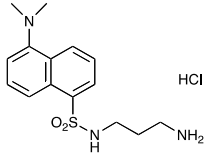
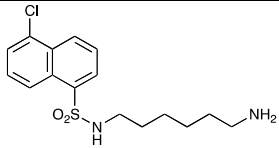
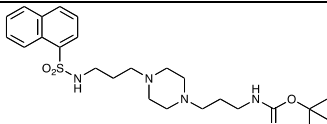
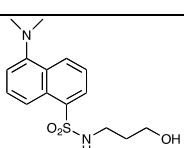
S2 : Automatization of the endothelial wound closure assay

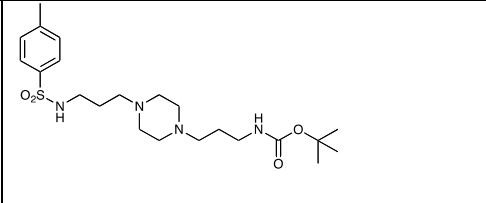
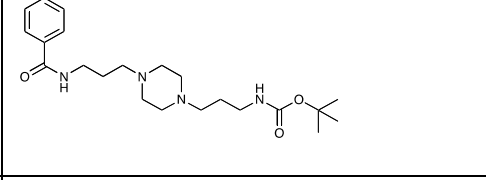
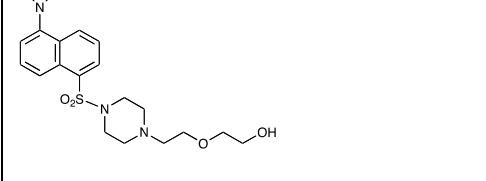
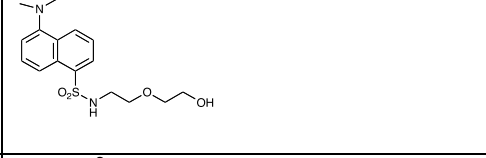
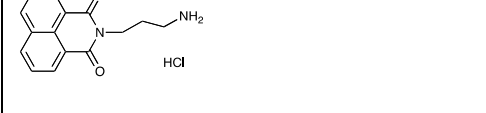
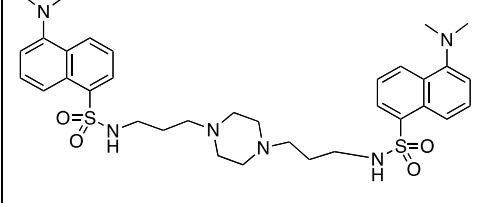
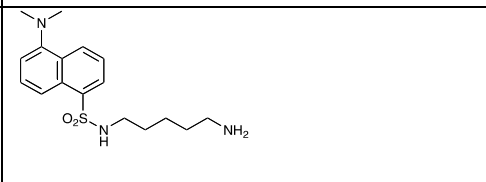
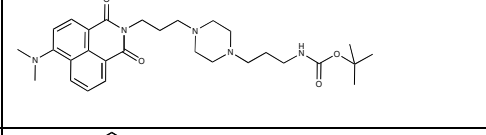
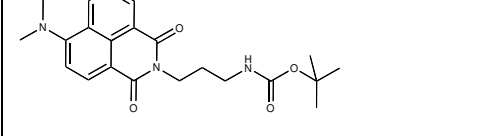
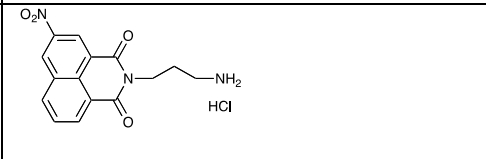
Monolayers of fluorescent HMEC-GFP cells were grown in 96 well-plates and automatically scratched by the HTS robot. Cells were then incubated for 24h in the presence of 10% FCS and the various molecules to be tested. The negative (0.5% FCS alone) and positive (10% FCS alone) controls are also presented. A : fluorescence microscopy imaging of wound closure at time 0h (left column) and 24h (right column). B : Numerization of the images as indicated in Material and Methods allowing quantification of % of wound closure (indicated in the upper right corners of each panel).

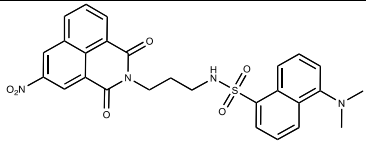
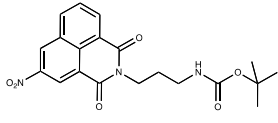
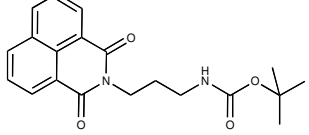
S3 : Structure and activity of COB223 and its chemical analogs on HMEC-GFP and 3T3-GFP wound closure.

Each compound was tested at various concentrations (3.125 μ M to 100 μ M) in the presence of 10% FCS in cell scratching assays using either HMEC-GFP or 3T3-GFP cells. Quantitation of wound closure after 24h allowed to determine the IC50 of the compound for each cell type. The fifth column indicates the ratio between the IC50s on both cell types. The sixth column indicates logP as determined for each structure.

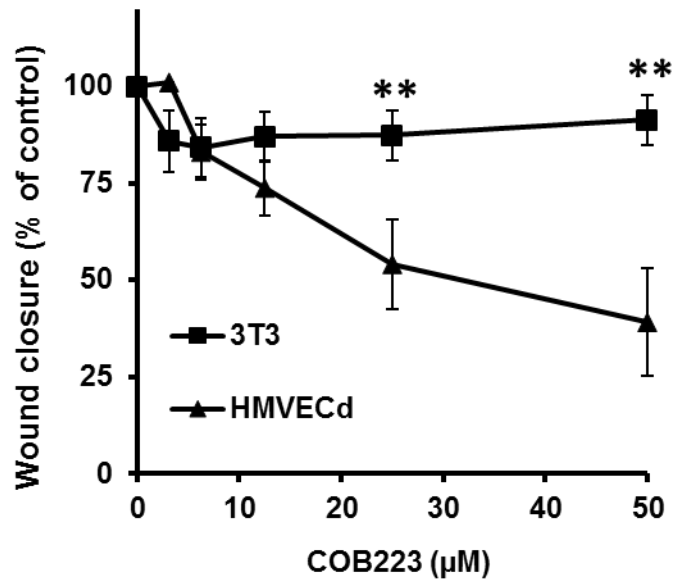
Compound	Formula	IC50 HMEC-GFP	IC50 3T3-GFP	Activity (HMEC vs 3T3)	logP
COB223		5	25	5	2.6
COB295		5	ND		3.5
COB296		5	ND		2.5
COB275		12.5	50	4	2.5
COB278		12.5	25	2	3.2
05-06-F11		15	40	2.6	3.7
COB227		18	50	13.9	2.6

05-102-B09		18	150	8.3	2.6
COB238		20	>50	>2.5	0.9
COB221		20	150	7.5	1.9
COB228		25	40	1.6	1.1
COB281		25	>50		2.3
COB280		25	>100		2.5
05-06-L-D03		25	200	8	1.2
W7		35	35	1	3.0
COB235		40	>50	>1.25	2.4
COB220		40	>50	>1.25	1.2

COB236		50	>	>50		2.0
COB237		50	>	>50		1.7
COB224		50	>	>50		1.3
COB225		50	>	>50		1.1
COB226		50	>	>50		1.1
COB222		50	>	>50		3.6
dansylcadaverine		>50	>	>50		2.1
COB274		>100		ND		2.7
COB276		>100		ND		2.7
COB277		>100		ND		2.6

COB279		>100	ND		3.6
COB282		>100	ND		2.6
COB283		>100	ND		2.6
Ethylene diamine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND		
1,3-diaminopropane	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND		
putrescine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND		

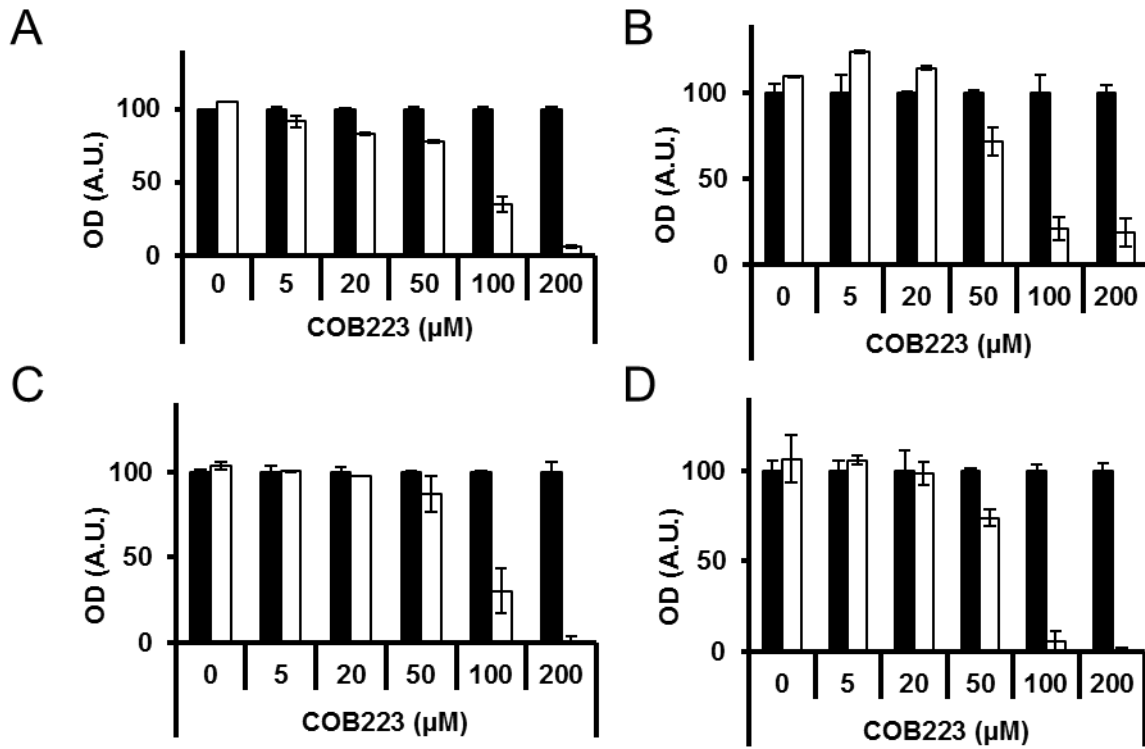
Supplementary-3 Table 1



S4

S4 : Endothelial cell-specific inhibition of wound closure by COB223

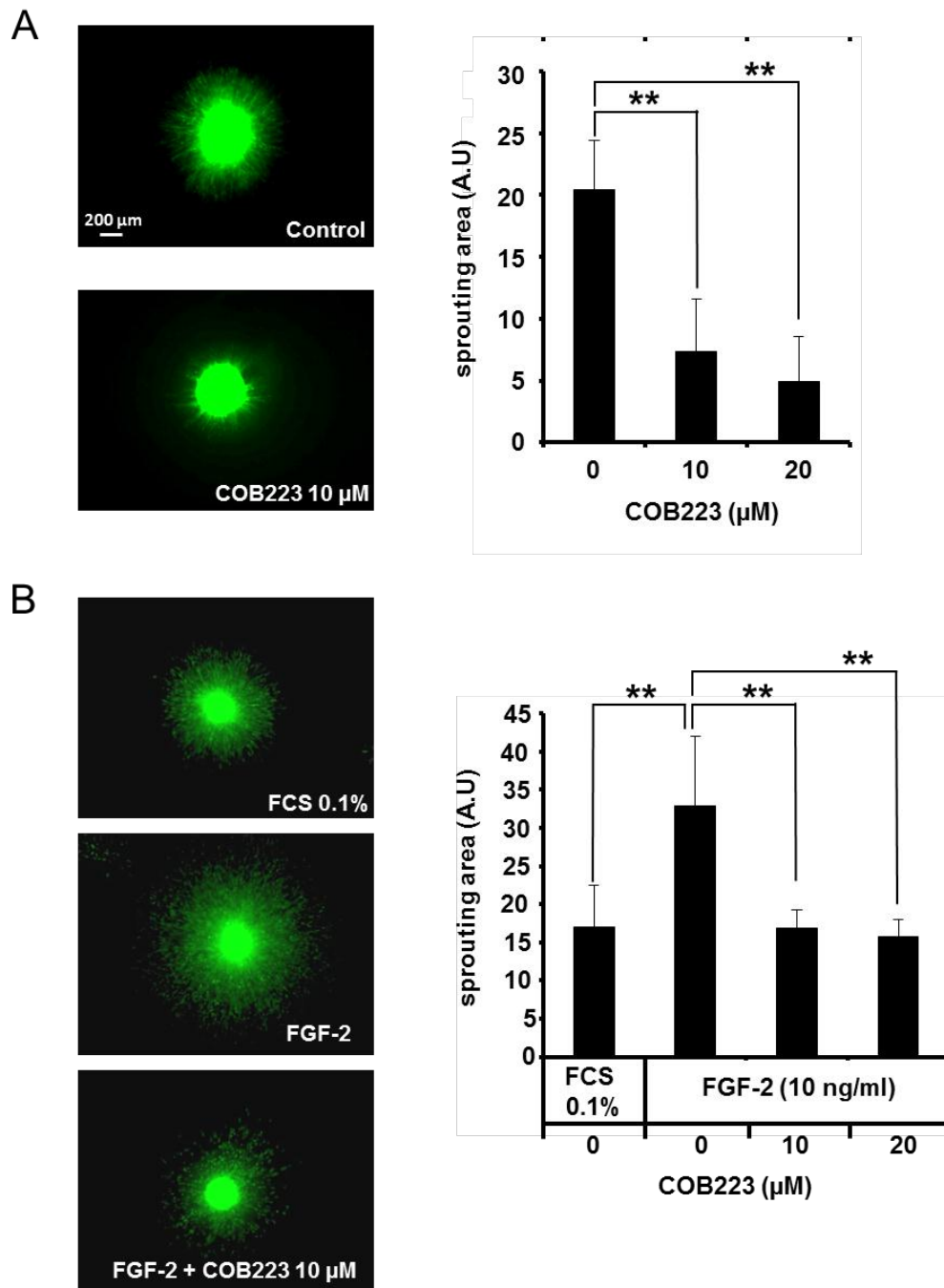
The dose-dependent effect of COB223 on cellular wound closure was measured as described in Material and Methods on either HMVECd or on 3T3 cells. The results are expressed as the percentage of wound closure (with closure observed in the presence of 10% FCS taken as 100%) : mean values +/- SD from three experiments.



S5

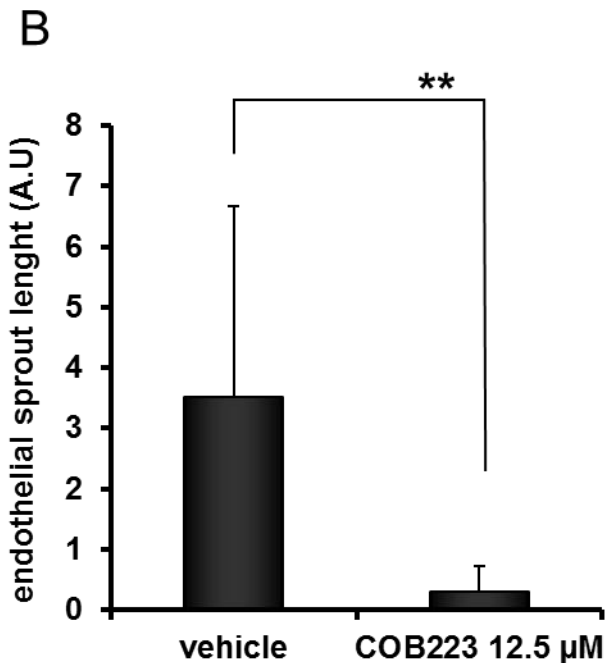
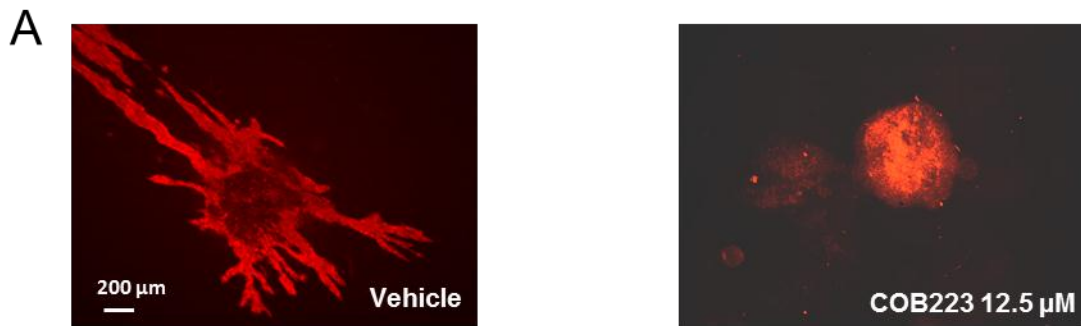
S5 : Cytotoxicity assay of COB223

Cellular toxicity was determined on confluent HMVECd (A), HUVEC (B), 3T3 (C) or LLC (D) cell cultures treated by various concentrations of COB223 (white bars) or vehicle (black bars) for 48 h. The number of viable cells was quantitated using the tetrazolium blue assay, as described in Material and Methods. The results are expressed as means \pm SEM from 3 independent experiments. * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$



S6: Effect of COB223 on HMEC-GFP spheroid sprouting into collagen gels.

A : Spheroids of HMEC-GFP cells were grown in collagen gels containing the indicated concentrations of COB223. The sprouting area was measured from images taken at day 4 using Cell Profiler software. B : Spheroids of HMEC-GFP cells were grown in collagen gels containing either 0.1% FCS or 10 ng/ml FGF-2 and the indicated concentrations of COB223. The sprouting area was measured from images taken at day 3 using Cell Profiler software. Data are the mean \pm SD from the analyses of 10-12 spheroids (** $p < 0.01$). Each graph is representative of at least 4 independent experiments.



S7

S7 : Effect of COB223 on vascular sprouting of embryoid bodies into collagen gels

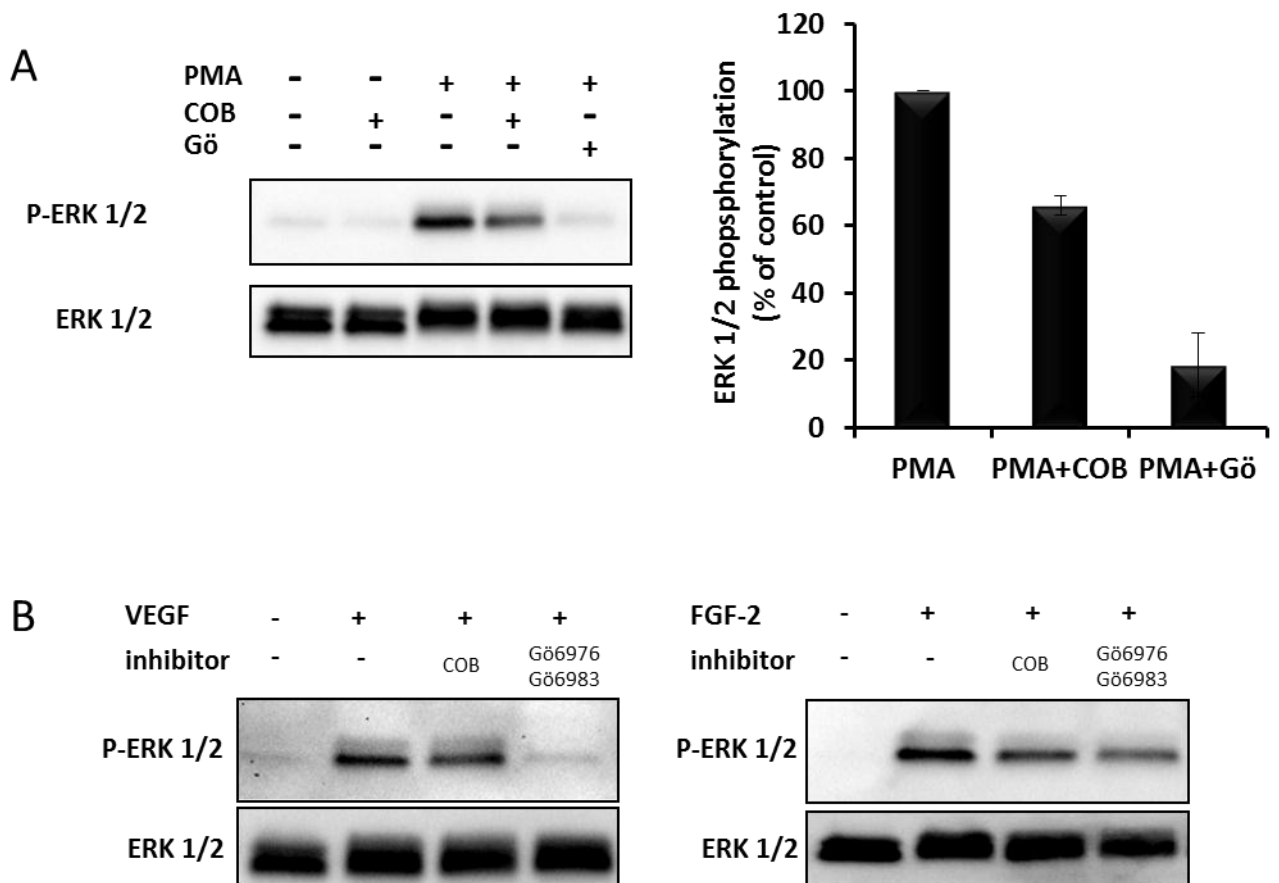
A : Embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells (as described in Material and Methods) were grown in collagen gels in the presence of 12.5 μM COB223 or vehicle. On day 10 of culture, cells committed into the endothelial lineage were visualized by *in toto* immunofluorescent staining using anti-CD31 antibodies. B : The total surface occupied by endothelial sprouts was measured by image analysis of the pictures taken under an epifluorescence microscope. Data are means +/- SD of analyses performed on 17 and 19 spheroids per condition. Similar results were obtained in 2 independent experiments. ** : $p < 0.01$.

S8 : List of protein-kinases that are insensitive to COB223 *in vitro*.

In vitro kinase assays were performed with each of these purified protein-kinases in the presence or the absence of various concentrations (0.5 up to 100 μ M) of COB223. None of these kinase activities was inhibited by more than 5% in the presence of these concentrations of COB223.

Receptors : EGFR, FGFR1, FGFR2, VEGFR2 (KDR), Insulin Receptor, PDGFR β , TGF β R1, Met, Tie2

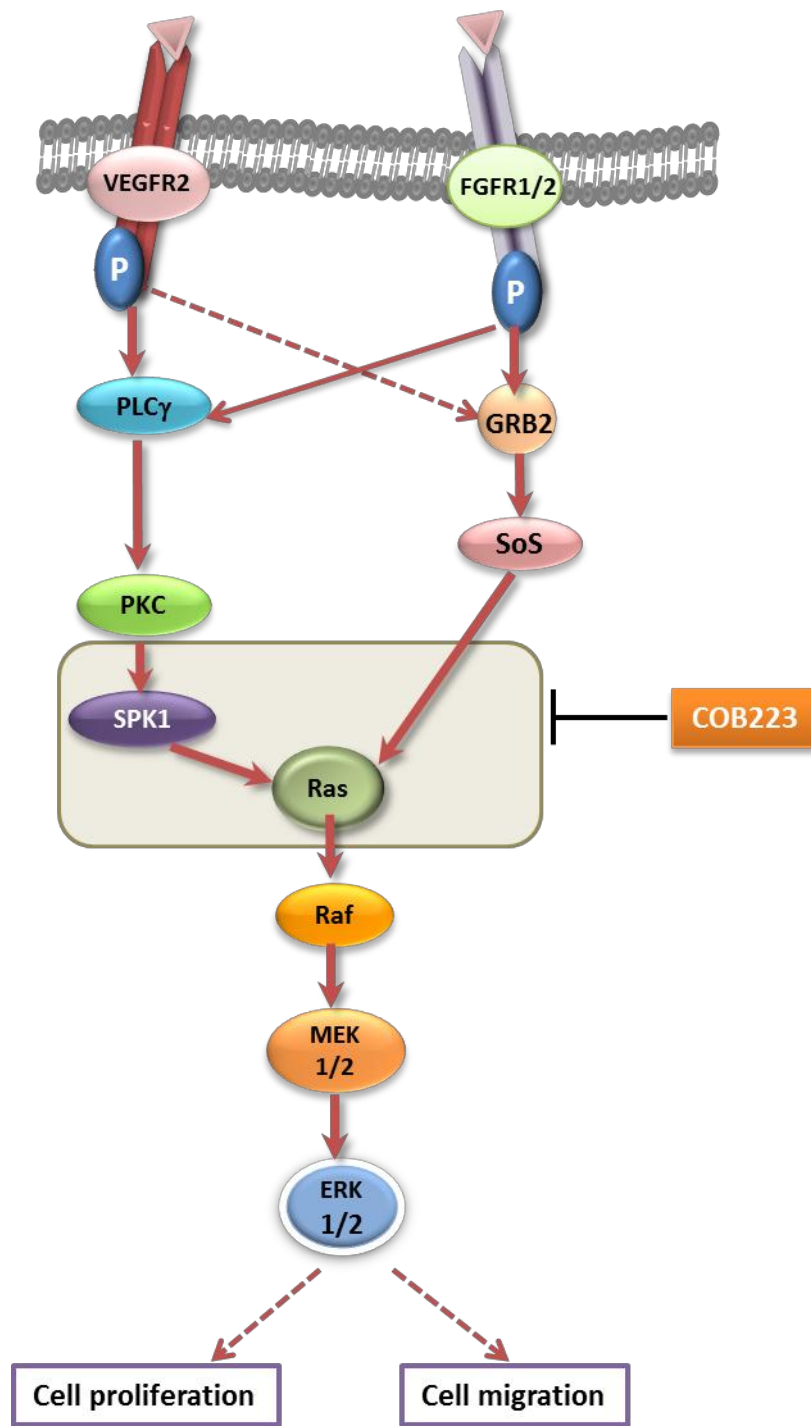
Intracellular protein-kinases : MEK1, ERK1, ERK2, Raf, FAK, CK2, CDK2/cyclin A, CDK2/cyclin E, CDK6/cyclin D3, PKC α , PKC β _I, PKC β _{II}, PKC ζ .



S9

S9 : Effect of PKC inhibitors on PMA-, VEGF- and FGF2-induced ERK phosphorylation.

A : Serum-starved HUVEC cells were incubated for 5 min in the presence of 200 nM of PMA and in the absence or the presence of 25 μ M COB223 or 5 μ M Gö6983 and 5 μ M Gö6976. The hybridization signals observed were quantitated and the ratio between phospho-ERK1/2 and ERK1/2 was normalized to the values observed in the absence of COB223. Similar results were obtained in 2 independent experiments. B : Serum-starved HUVEC cells were incubated for 15 min in the presence of 10 ng/mL VEGF-A or 20 ng/mL FGF-2 and in the absence or the presence of 25 μ M COB223 or 5 μ M Gö6983 and 5 μ M Gö6976. The phosphorylation ERK1/2 was then analyzed by Western blot analysis of the cell lysates as described in Material and Methods. Western blots for total ERK1/2 were used as loading controls.



S10

S10 : Mechanism of action of COB223 on the ERK pathway.

Full red arrows show the ERK signaling pathway that we established in HUVEC. The grey box indicates where the target of COB223 is located.

6 Criblage de la chimiothèque de l'Université de Grenoble

6.1 Mise au point du test

Dans un premier temps, nous avons choisi un test cellulaire d'angiogenèse qui soit pertinent et puisse être adapté aux conditions d'un criblage à haut débit. Il s'agit de respecter les critères suivants : il doit être facile à mettre en œuvre, rapide, au format 96 puits, reproductible, aisément quantifiable et robuste.

Si certains tests cellulaires tridimensionnels tels que la croissance de sphéroïdes endothéliaux en trois dimensions récapitulent bien les différentes étapes de l'angiogenèse - migration, prolifération, invasion- en revanche, ils sont difficilement miniaturisables. L'utilisation d'un modèle simple optimise les possibilités de standardisation. Le choix s'est donc porté sur le test bien connu de blessure/cicatrisation d'une monocouche de cellules endothéliales.

6.1.1 Modèle cellulaire

Les cellules endothéliales primaires présentent beaucoup de variabilité de lot à lot et c'est pourquoi notre choix s'est tourné vers la lignée de cellules endothéliales immortalisées HMEC-1. Par ailleurs, afin de faciliter la visualisation et l'acquisition des images des blessures, les cellules HMEC-1 ont été infectées par un rétrovirus codant pour l'eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) afin de les rendre constitutivement fluorescentes. Un sous-clonage a permis d'obtenir un clone stable exprimant fortement la GFP dans toutes les cellules (appelées HMEC-GFP, Figure 41), et dont la fluorescence ne diminue pas au cours des passages.

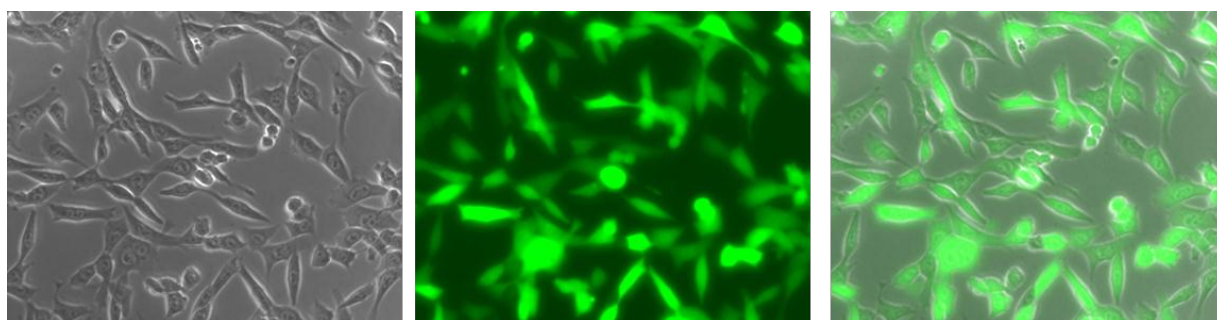


Figure 41 : Cellules HMEC-GFP.

(De gauche à droite : contraste de phase, fluorescence et superposition)

6.1.2 Réalisation du test

Le test de blessure a été adapté à la plate-forme de criblage à haut débit de l'institut iRTSV (Laboratoire pour le criblage de molécules bioactives Gen&Chem, U1038, CEA-

Grenoble). En adaptant la position, le mouvement et la profondeur de déplacement du bras du robot, la monocouche de cellules endothéliales est blessée de manière uniforme dans tous les puits de la plaque et ce de manière reproductible (Figure 42), puis le robot procède au lavage des puits et à la distribution des molécules criblées.

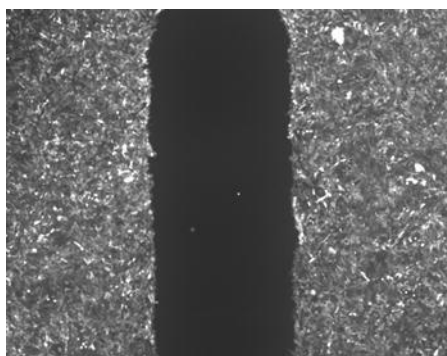


Figure 42 : Blessure des cellules HMEC-GFP par le robot de criblage.

6.1.3 Choix de la chimiothèque

En ce qui concerne la chimiothèque, notre choix s'est porté vers la collection académique des laboratoires CNRS de l'Université de Grenoble. Elle est constituée de 1360 molécules originales dont nous avons pu tester l'activité anti-angiogène potentielle. Ces composés repris dans le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) sont préparés dans des plaques 96 puits conservées à 4°C. Dans notre test automatisé, les molécules sont utilisées à la concentration de 25 μ M dans du milieu de culture contenant 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal) et 0.5 % de DMSO. Dans un premier temps, chacune de ces molécules a été testée en triplicat.

Le développement de macro-commandes à la fois sur les logiciels ImageJ et Cell Profiler m'ont permis de quantifier de manière automatique le taux de fermeture des blessures. Deux photographies du même puits sont prises sur un microscope inversé à épifluorescence l'une juste après la blessure et la mise en présence des molécules, l'autre 24h plus tard. Les images obtenues sont binarisées et l'aire occupée par les cellules HMEC-GFP quantifiée à t0 et t24 heures (Figure 43 et S2 de l'article).

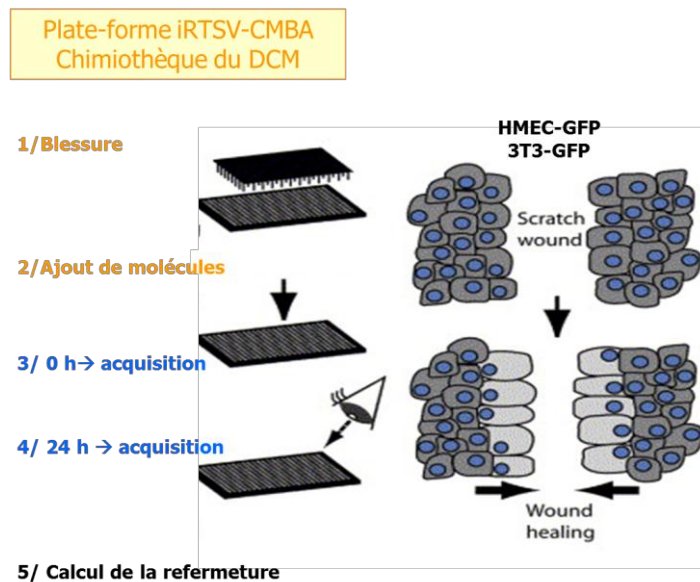


Figure 43 : Schéma du protocole de criblage.

En outre, deux contrôles sont introduits dans chaque plaque. L'un dit « bio-inactif » est un contrôle positif de fermeture de la blessure : les cellules sont uniquement mises en présence de milieu de culture contenant 10% de SVF et 0.5% DMSO correspondant à la concentration diluant les molécules. Dans cette condition, après 24h, les blessures sont fermées à environ 75%. Le second contrôle dit « bio-actif », est réalisé avec du milieu contenant 0.5% de SVF et 0.5% de DMSO. Dans ce cas, le taux de fermeture de la blessure avoisine les 25%. Ces contrôles ont deux intérêts. D'une part, les composés potentiellement anti-angiogènes donneront un taux de fermeture de la blessure proche de celui du contrôle bio-actif. Par ailleurs, les contrôles bio-actifs et bio-inactifs permettent le calcul du facteur z' . Comme indiqué dans l'introduction, le calcul du facteur z' permet de juger de la fiabilité d'un test [Zhang et al., 1999]. Ce coefficient permet de prendre en compte la dynamique du signal mesuré d'une part et la variation des données liée à la mesure du signal d'autre part. Il est calculé de la manière suivante :

$$z' = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|}$$

où

σ_p = déviation standard des contrôles bio-inactifs

σ_n = déviation standard des contrôles bio-actifs

μ_p = moyenne de signal des contrôles bio-inactifs

μ_n = moyenne de signal des contrôles bio-actifs

Un test est fiable si le facteur z' est supérieur à 0.5. Dans notre test, $z=0.59$. Cette valeur a validé la fiabilité et la reproductibilité du test. Avec cette preuve de concept, j'ai démontré que notre test est adapté au criblage à haut débit.

6.2 Criblage primaire sur les HMEC-GFP, et secondaire sur les 3T3-GFP

Ainsi, nous avons pu cribler les 1360 molécules de la chimiothèque avec ce modèle. Nous avons pu distinguer quatre phénotypes (Figure 44) : a) molécule potentiellement anti-angiogène ; b) molécule sans effet sur la migration ; c) molécule fluorescente ; d) molécule cytotoxique.

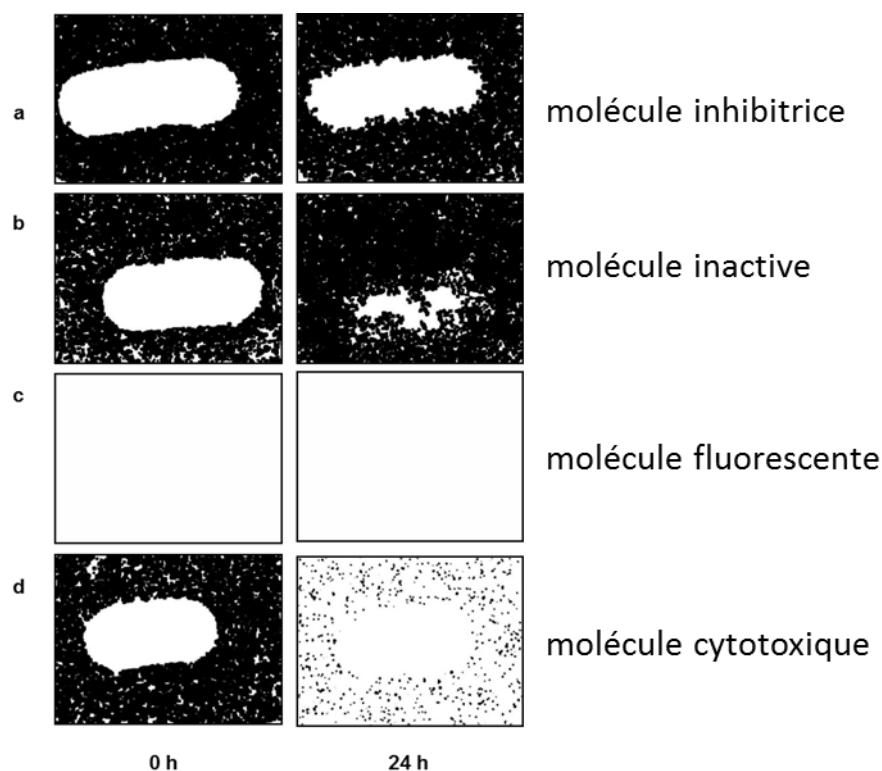


Figure 44 : Phénotypes observés au cours du criblage.

Seul le premier cas a retenu notre attention, et, à l'issue du criblage des 1360 molécules de la chimiothèque académique des laboratoires CNRS de l'Université de Grenoble, nous avons retenu 80 molécules qui étaient des inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales (de 75% au minimum). Cette étape m'a permis également de faire la preuve de concept de notre système (calcul du facteur z').

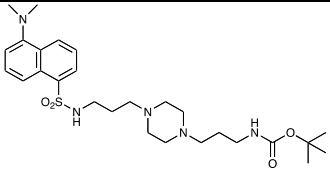
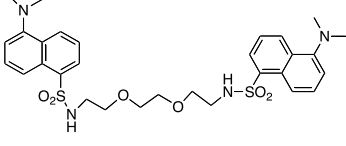
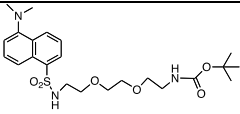
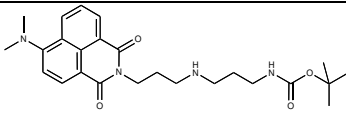
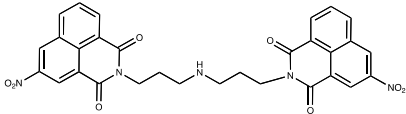
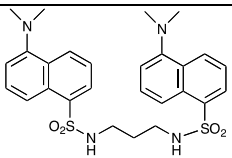
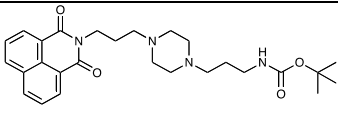
Cependant, il était nécessaire de distinguer les molécules qui inhibaient spécifiquement les capacités migratoires et prolifératives des cellules endothéliales de celles qui peuvent inhiber tout type cellulaire. Pour ce faire, les 80 molécules issues du premier criblage ont été testées sur le même test de blessure réalisé avec des cellules fibroblastiques de souris (3T3) précédemment rendues fluorescente par expression de la GFP (3T3-GFP).

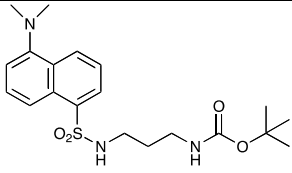
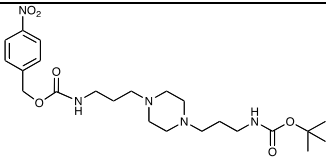
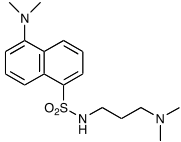
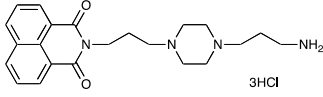
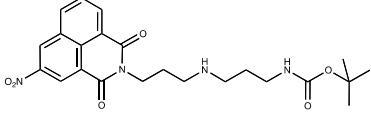
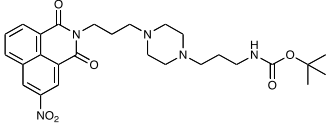
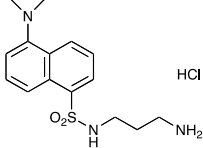
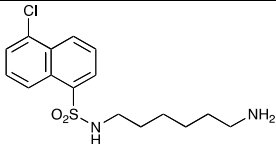
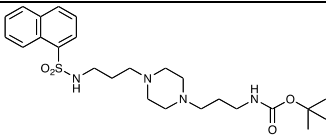
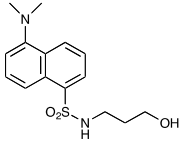
L'activité inhibitrice de ces molécules a été évaluée sur les cellules HMEC-GFP et 3T3-GFP (Figure 1B de l'article). Nous nous sommes intéressés aux molécules présentant le meilleur différentiel d'activité entre les 3T3-GFP et les HMEC-GFP. Ainsi, dans ce criblage complet, 26 molécules inhibaient spécifiquement la migration des cellules endothéliales et 5 molécules

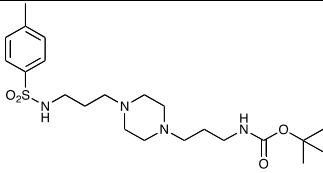
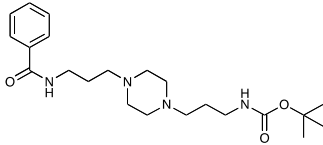
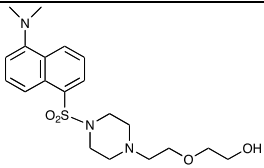
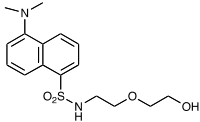
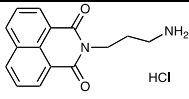
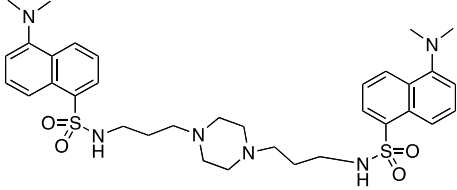
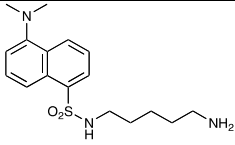
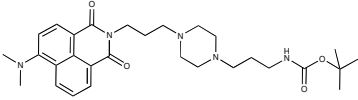
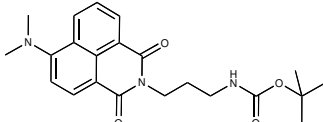
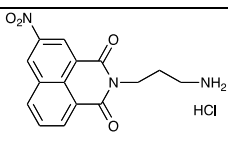
présentaient une efficacité importante. Les molécules les plus actives sont des composés dérivés des polyamines.

6.3 Caractérisation de deux familles de molécules bio-actives

Après discussion avec nos collègues chimistes de la chimiothèque de l'Université de Grenoble, une vingtaine d'analogues structuraux ont été synthétisés. Cela nous a permis d'établir la structure minimale active. Les composés ont été testés sur les cellules HMEC-GFP et 3T3-GFP sur le test de blessure avec des concentrations croissantes. Les IC50 ainsi déterminées sont notées dans le tableau suivant (Tableau 8).

Composé	Formule	IC50 HMEC-GFP	IC50 3T3-GFP	Activité (HMEC vs 3T3)
COB223		5	25	5
COB295		5	ND	
COB296		5	ND	
COB275		12.5	50	4
COB278		12.5	25	2
05-06-F11		15	40	2.6
COB227		18	250	13.9

05-102-B09		18	150	8.3
COB238		20	>50	>2.5
COB221		20	150	7.5
COB228		25	40	1.6
COB281		25	>50	
COB280		25	>100	
05-06-L-D03		25	200	8
W7		35	35	1
COB235		40	>50	>1.25
COB220		40	>50	>1.25

COB236		>50	>50	
COB237		>50	>50	
COB224		>50	>50	
COB225		>50	>50	
COB226		>50	>50	
COB222		>50	>50	
dansylcadaverine		>50	>50	
COB274		>100	ND	
COB276		>100	ND	
COB277		>100	ND	

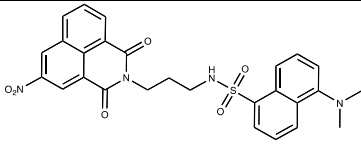
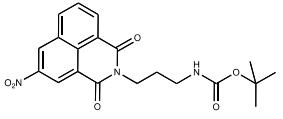
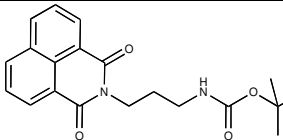
COB279		>100	ND	
COB282		>100	ND	
COB283		>100	ND	
Ethylene diamine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND	
1,3-diaminopropane	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND	
putrescine	$\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$	>100	ND	

Tableau 8 : EIC50 des composés testés sur les HMEC-GFP et 3T3-GFP.

A l'issue de ce criblage, nous nous sommes alors particulièrement intéressés aux molécules COB223 (Figure 45) et COB227 (Figure 46).

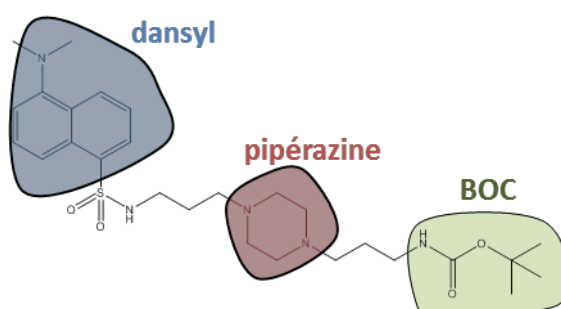


Figure 45 : Structure de la molécule COB223.

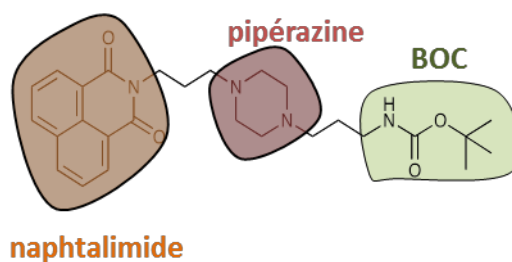


Figure 46 : Structure de la molécule COB227.

COB223 a une IC50 de 5 μM sur les HMEC-GFP versus une IC50 de 25 μM sur les 3T3-GFP. De toutes les molécules à notre disposition, COB223 s'est avérée la plus efficace dans les tests d'angiogenèse *in vitro*. A ce jour, elle reste la structure minimale identifiée comprenant un groupement dansyl, une pipérazine et un BOC. Le cycle dansyl confère la lipophilie aux composés et est fluorescent à 330 nm. L'autre composé qui a retenu notre attention, COB227, présente une activité quatorze fois plus importante sur les HMEC-GFP que sur les 3T3-GFP.

Les composés étant des dérivés polyaminés, nous avons inclus dans nos tests les polyamines naturelles (putrescine, 1,3-diaminopropane et ethylene diamine). Ces polyamines sont inefficaces sur les deux types cellulaires.

L'analyse de la relation structure-activité montre que les groupements aromatiques dansyl (dans COB223) ou naphthalimide (dans COB227) sont des éléments essentiels pour leur activité. De plus, ces deux composés possèdent un groupement BOC (fonction tert-butylloxycarbonyl), également nécessaire pour obtenir l'efficacité maximale des molécules.

Les deux molécules COB223 et COB227 ont été plus étudiées dans la suite du projet. Néanmoins, COB227 a rapidement été abandonnée par la suite, car cette molécule n'a pas démontré d'activité anti-angiogène et anti-tumorale *in vivo*.

C'est pourquoi, nous nous sommes concentrés sur COB223, notre molécule leader, que j'ai testé sur différents types de tests d'angiogenèse, *in vitro* et *in vivo* et pour laquelle j'ai essayé de déterminer son mécanisme d'action.

6.4 Analyse de l'activité de COB223 sur différents types endothéliaux

✓ Test de blessure

Différents types cellulaires ont servi à tester les molécules d'intérêts et notamment COB223. Afin de vérifier la différence d'activité vue sur les HMEC-GFP par rapport aux 3T3-GFP (Figure 1B de l'article), j'ai tout d'abord vérifié que ce différentiel existait toujours en utilisant les cellules HMEC-1 et 3T3 non transfectées avec la GFP, la GFP ayant pu modifier leur phénotype.

Là encore, nous avons observé une activité préférentielle de COB223 sur la migration des cellules HMEC-1 par rapport aux 3T3. En traitant les cellules par des quantités croissantes de molécules j'ai pu déterminer l'IC50. Les IC50 déterminées sont pour chacun des types cellulaires notées dans le tableau suivant (Tableau 9) :

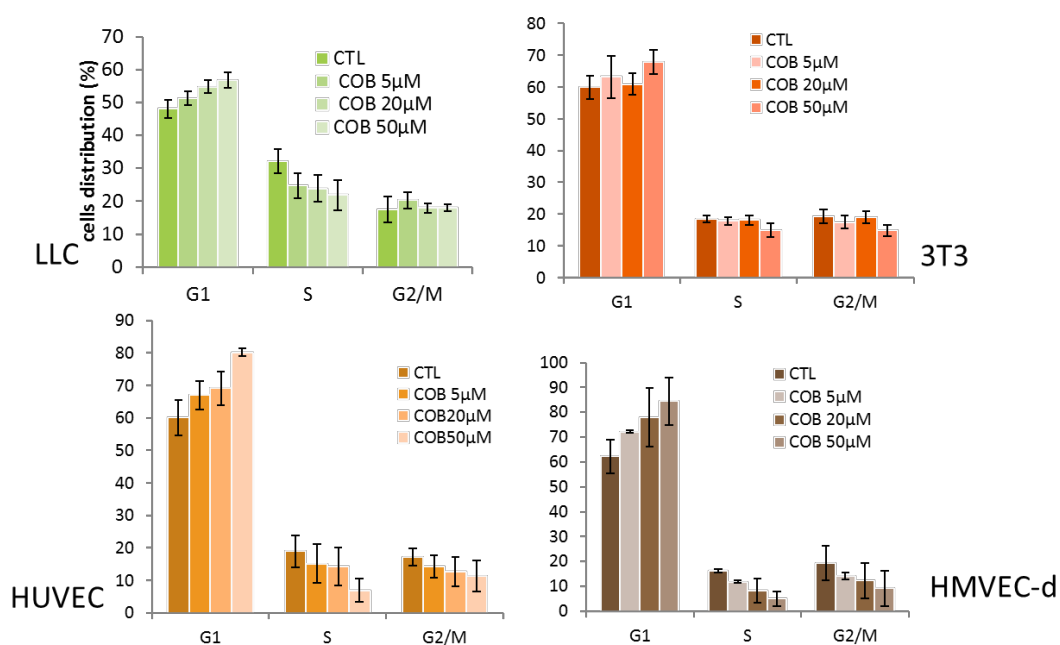
	HMEC-GFP	3T3-GFP	HMEC-1	3T3
COB223	3-5 μM	25 μM	25 μM	100 μM

Tableau 9 : Inhibition de la fermeture d'une blessure par COB223. Détermination de l'IC50.

Néanmoins, nous avons noté que l'IC50 est plus importante pour ces deux types de cellules que pour des lignées exprimant la GFP. Pour se rapprocher d'un système plus physiologique, nous nous sommes ensuite intéressés à l'activité sur les cellules endothéliales primaires HMVECd et HUVEC. Les IC50 alors observées varient de 5 μ M à 40 μ M (S4 de l'article). Cette variabilité est due à l'hétérogénéité des cellules endothéliales primaires. Pour d'autres types cellulaires non endothéliaux (COS.7, HeLa) COB223 présente une IC50 similaire à celle obtenue avec les 3T3.

✓ Prolifération

Les propriétés anti-prolifératives de COB223 sur différents types cellulaires ont été évaluées par une mesure de l'incorporation de thymidine tritiée (Figure 1C, 1D, 1E et 1F de l'article) d'une part et par l'analyse du cycle cellulaire en FACS d'autre part (Graphique 4).



Graphique 4 : Effet de COB223 sur le cycle cellulaire de différents types cellulaires.

Les deux méthodes ont montré qu'après 24h de traitement, COB223 inhibe la prolifération des cellules endothéliales primaires et des cellules tumorales dès 5 μ M et ce, de manière dose-dépendante. Cependant, COB223 n'est pas efficace sur les cellules fibroblastiques 3T3.

J'ai ensuite analysé la phosphorylation de ERK1/2 par Western Blot des extraits protéiques d'HUVEC stimulées par du SVF en présence de différentes concentrations de COB223 (Figure 47). Sur ces échantillons, on observe une diminution de la phosphorylation de ERK1/2 induite par le SVF.

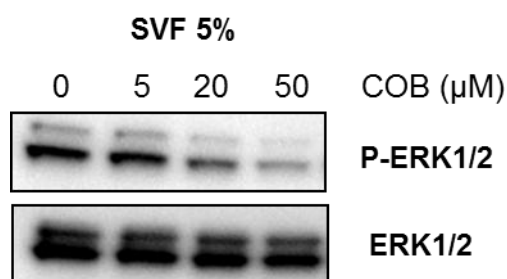


Figure 47 : Analyse par WB de l'effet de COB223 sur la voie ERK.

La voie de signalisation ERK est la principale voie impliquée dans la prolifération des cellules HUVEC. Ces résultats sont donc cohérents avec la diminution de la prolifération observée en analyse du cycle cellulaire et par incorporation de thymidine tritiée. Ces premières observations ont ensuite orienté notre étude mécanistique vers l'étude de la voie de signalisation ERK.

✓ Viabilité et toxicité

Pour déterminer la viabilité des cellules en présence de COB223, j'ai utilisé un test WST1 (Roche). Dans ce test, des sels de tétrazolium sont ajoutés dans le milieu des cellules contenant 0.5% SVF. Une déshydrogénase mitochondriale transforme ces sels en formazan dont l'absorbance est quantifiable à 440 nm. La mesure de la DO à cette longueur d'onde est le reflet de la viabilité des cellules. J'ai établi que COB223 n'a pas d'effet toxique aux concentrations utilisées dans nos tests (S5 de l'article). La toxicité n'apparaît qu'au-delà de 24 heures à plus de 50 μ M. Les effets observés sur la migration et la prolifération ne sont pas dus à un effet toxique.

6.5 Effet sur l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*

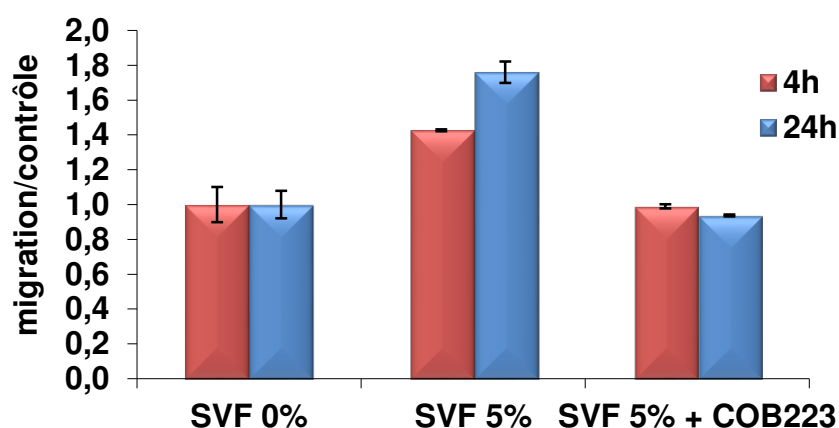
✓ *In Vitro*

J'ai déterminé l'activité anti-angiogène de COB223 dans d'autres tests d'angiogenèse plus complets. J'ai évalué la capacité de COB223 à inhiber la migration et l'invasion des cellules endothéliales sur 3 tests cellulaires (bourgeonnement endothélial, différenciation des cellules souches embryonnaires murines et migration en chambre de Boyden).

Pour le premier test, des sphéroïdes de cellules HMEC-GFP sont inclus dans un gel de collagène de type I en présence ou non de COB223 à 10 et 20 μ M. Après quelques jours, les sphéroïdes bourgeonnent spontanément. Ce bourgeonnement est amplifié en présence de FGF-2. Dans les deux cas, j'ai constaté que la molécule inhibait fortement le bourgeonnement (respectivement de 50% et 70%) (S6 de l'article).

Sur le modèle de différenciation des cellules souches embryonnaires murines en cellules endothéliales, j'ai observé que COB223 inhibe le bourgeonnement endothélial. Une concentration faible de l'ordre de 12.5 μ M inhibe totalement le bourgeonnement (S7 de l'article).

Enfin, COB223 inhibe la migration des cellules dans un test en chambre de Boyden. Les cellules utilisées, les HMVECd sont ensemencées sur le filtre et le chimioattractant ajouté dans la chambre inférieure est le sérum. Là encore, en présence de 20 μ M de COB223 dans le milieu, les HMVECd ne migrent pas à travers le filtre (Graphique 5). Cet effet est visible dès 4 heures et persiste à 24 heures.



Graphique 5 : Effet de COB223 sur la migration endothéliale en chambre de Boyden.

L'ensemble de ces résultats confirme l'activité anti-angiogène *in vitro* de la molécule COB223.

✓ In Vivo

A ce stade, il était nécessaire d'évaluer le potentiel anti-angiogène *in vivo* de ce composé. Nous avons choisi le modèle d'implantation sous-cutanée d'éponge chez la souris décrit dans l'introduction. Le jour de l'implantation, les éponges de cellulose sont imprégnées du facteur angiogène FGF-2 (200 ng) en présence ou non de COB223 (100 μ M) ou de son solvant. Des injections similaires dans l'éponge à travers la peau sont répétées les 2 jours suivants. Après une semaine, l'angiogenèse a été visualisée par imagerie de fluorescence en injectant le RAFT-RGD-Cy5 qui va cibler spécifiquement l'intégrine α β 3 des néo-vaisseaux. L'induction de l'angiogenèse par le FGF-2 est fortement diminuée en présence de COB223 (Figure 2 de l'article). Après retrait de l'éponge, l'observation macroscopique et la quantification de l'hémoglobine dans l'éponge confirment l'effet anti-angiogène *in vivo* de COB223.

J'ai ainsi démontré que nous avons sélectionné une molécule, COB223, qui inhibe l'angiogenèse à la fois dans les modèles *in vitro* et *in vivo*. Les thérapies anti-angiogènes

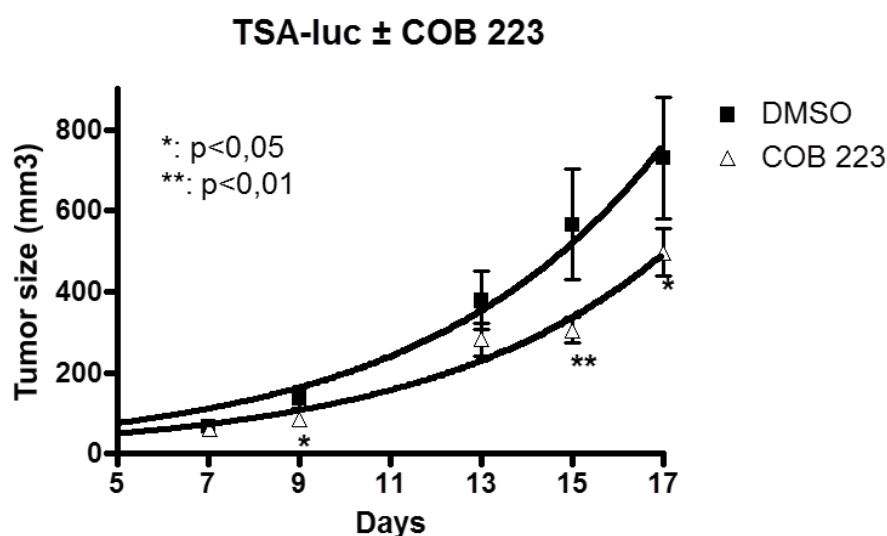
représentent une stratégie thérapeutique dans le traitement des cancers. Il était alors pertinent d'évaluer son activité anti-tumorale.

6.6 Effet sur la tumorigénèse *in vivo*, modèle TSA-luc et LLC/2-luc

Afin d'évaluer l'activité de COB223 sur le développement tumoral, nous avons utilisé deux modèles de tumorigénèse *in vivo*.

Le premier modèle que nous avons choisi consistait à utiliser des cellules TSA (cellules de carcinome mammaire murin) exprimant la luciférase (TSA-luc) [Sancey et al., 2009]). Les cellules en suspension dans 100 µL de Matrigel sont implantées dans le flanc droit de souris Nude en sous-cutanée. La croissance des tumeurs est mesurée au pied à coulisse mais également par l'injection de luciférine. La quantité de lumière générée par les cellules est donc le reflet de la croissance tumorale. Il s'agit d'une technique d'imagerie non invasive par bioluminescence. En contrôle la taille des tumeurs est également mesurée au pied à coulisse et évaluée par la formule $L \times l^2 \times 0,5$ dans laquelle L et l représentent la longueur et la largeur de la tumeur respectivement.

Quand les tumeurs atteignent 50 mm³, le groupe de souris traitées reçoit 25 mg/kg de COB223 en intrapéritonéal tous les deux jours. Le groupe contrôle est injecté avec du PBS (Phosphate Buffer Saline)-1.7% DMSO (solvant de COB223). Le suivi de la croissance se poursuit pendant deux semaines. Dans ce modèle, on observe une diminution significative de la croissance des tumeurs dans le groupe des souris traitées comparativement au groupe contrôle (Graphique 6). Ces résultats sont corrélés à une diminution de la luminescence chez les souris traitées (Figure 48 et Graphique 7).



Graphique 6 : Expérience de xénogreffe dans des souris Nude.

Implantation de cellules TSA-luc et mesure au cours du temps au pied à coulisse de la taille des tumeurs.

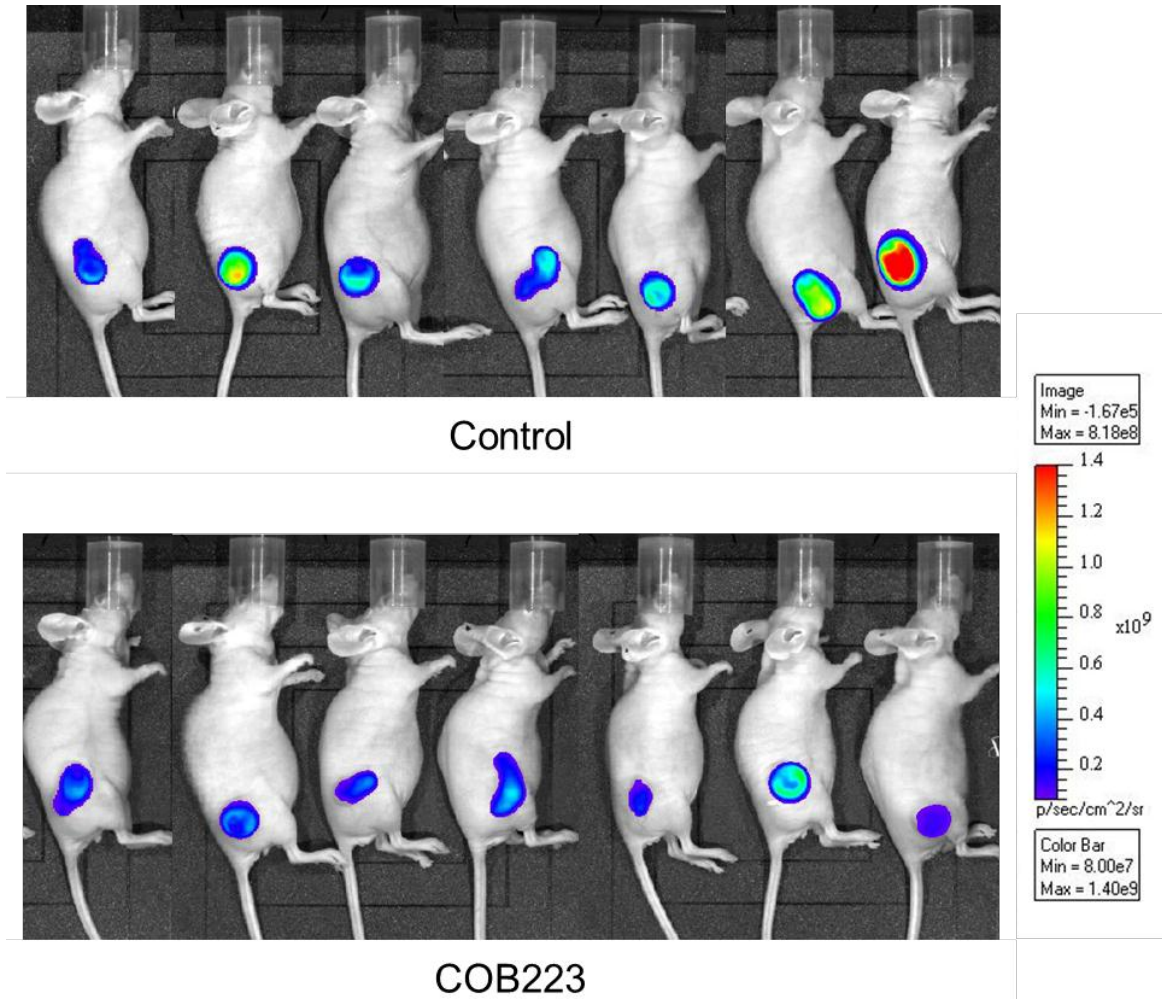
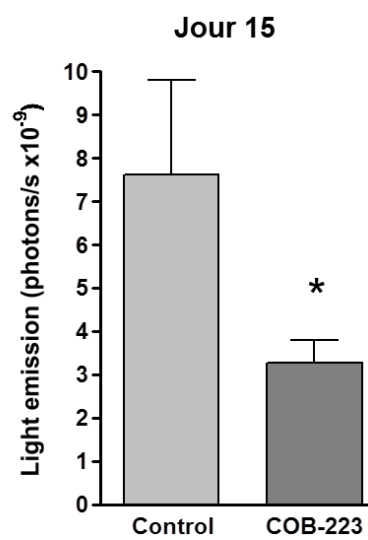


Figure 48 : Luminescence des tumeurs TSA-luc dans les souris Nude.



Graphique 7 : Quantification de la luminescence des tumeurs à J15.

Ces premiers résultats *in vivo* montrant un effet de COB223 sur la tumorigénèse, nous ont conduits à poursuivre nos recherches en utilisant une autre lignée tumorale, les LLC/2 (Lewis Lung Carcinoma/2) connue pour répondre aux thérapies anti-angiogènes [Zhou et al., 2013] [Kamlah et al., 2009] [Savai et al., 2009]. Les cellules sont implantées en sous-cutanée dans les souris Nude. Lorsque la taille des tumeurs atteint 50 mm³, les souris reçoivent 4 ou 16 mg/kg de COB223 en injection intrapéritonéale tous les deux jours ou du PBS-DMSO uniquement. Les cellules expriment de manière endogène la luciférase, ce qui m'a permis de suivre la croissance des cellules tumorales par bioluminescence et par mesure au pied à coulisse. Là encore, j'ai constaté une diminution significative de la taille des tumeurs. J'ai donc montré dans deux modèles de tumorigénèse *in vivo*, que COB223 réduit de manière significative, la croissance tumorale (Figure 3A de l'article).

J'ai procédé à des marquages sur les coupes de tumeurs. Après coloration hématoxyline-éosine, on observe une surface nécrotique des tumeurs augmentée de manière significative dans les souris traitées (Figure 3B et 3C de l'article). Dans 6 tumeurs traitées sur 10, la surface nécrotique occupe plus de 15% de la surface totale de la tumeur. C'est le cas dans uniquement 2 tumeurs contrôles sur 10. De plus, l'immunomarquage CD31 spécifique des cellules endothéliales révèlent que les tumeurs traitées sont moins bien vascularisées que les tumeurs contrôles (Figure 3A, 3D et 3E de l'article). Par ailleurs, COB223 présente une activité anti-proliférative *in vitro*, notamment sur les LLC/2. J'ai évalué sa capacité à empêcher la prolifération des cellules tumorales *in vivo*. Pour cela, j'ai mesuré deux marqueurs de la prolifération : phospho-histone H3, et l'activité de la voie ERK par la phosphorylation de ERK. Dans les deux cas, on observe une diminution significative du marquage phospho-histone H3 et phospho-ERK1/2 sur les coupes de tumeurs traitées par COB223 (Figure 3B et 3F). Pour expliquer ce résultat, deux hypothèses sont possibles : d'une part, la diminution de la taille des tumeurs pourrait être liée à une diminution de l'angiogenèse, et à une diminution de la prolifération cellulaire des cellules tumorales. Cet effet n'est pas corrélé avec une augmentation de l'apoptose cellulaire, car les marquages TUNEL (dUTP nick end labeling) n'ont pas montré de différences significatives entre les tumeurs traitées et non traitées. D'autre part, on peut également envisager que la diminution de la taille de la tumeur (effet direct de COB223 sur les cellules tumorales) peut contribuer à une diminution de la vascularisation tumorale.

7 Recherche de la cible et du mécanisme d'action

Parallèlement aux études *in vivo*, j'ai recherché le mode d'action et la cible moléculaire de COB223. D'après les résultats obtenus sur les tests d'angiogenèse, j'ai privilégié une approche sur les cellules endothéliales primaires.

7.1 Pénétration de COB223 dans les différents types cellulaires

Le groupement dansyl de COB223 lui confère une fluorescence ($\lambda=330$ nm). J'ai tiré parti de cette spécificité pour observer si COB223 pénétrait dans les cellules. Sur des cellules en culture j'ai ajouté COB223 à 25 μ M et suivi en microscopie, l'entrée de COB223. Dans les cellules endothéliales HMEC-1 (Figure 49), on remarque que COB223 s'internalise très rapidement dans les cellules. Après 5 minutes, on voit l'accumulation de COB223 dans le cytoplasme où il apparaît sous forme ponctuelle. Des résultats similaires ont été observés dans les HMVECd et les HUVEC.

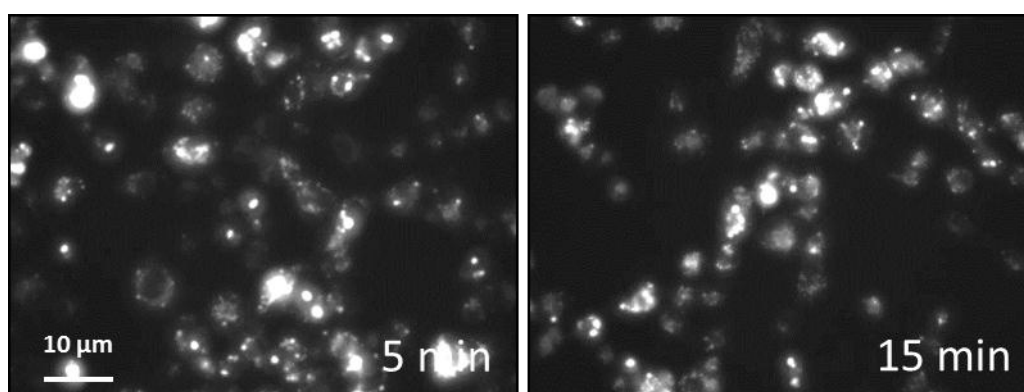


Figure 49 : Pénétration de COB223 dans les cellules HMEC-1.

A contrario, dans les cellules fibroblastiques 3T3, l'entrée de COB223 est beaucoup moins massive, les cellules apparaissent moins marquées (Figure 50).

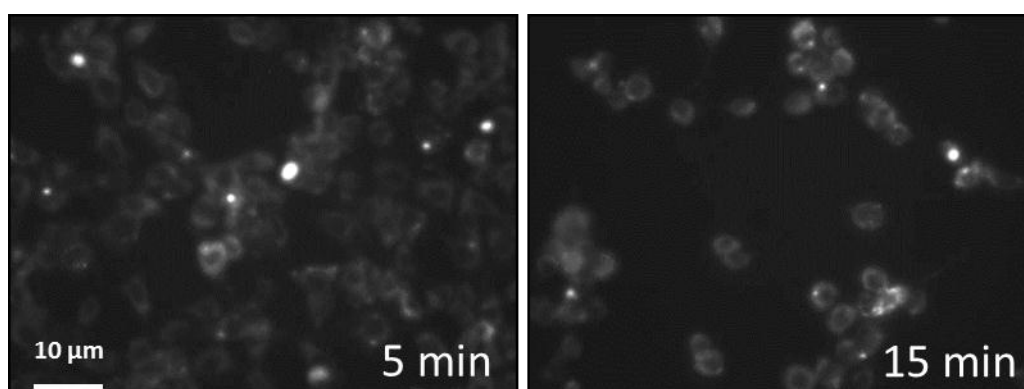


Figure 50 : Pénétration de COB223 dans les cellules 3T3.

Le fait que COB223 pénètre de manière moins efficace dans les cellules 3T3 pourrait être une explication à son inefficacité à inhiber la prolifération et la migration de ce type cellulaire. Dans tous les autres types cellulaires testés (COS.7, HeLa, LLC/2, MDA-MB231...)

nous avons observé que COB223 s'internalise dans les cellules avec une cinétique identique à celle vue dans les cellules endothéliales.

7.2 Effet intracellulaire de CO223

Les résultats précédents laissent penser que l'action de COB223 a lieu sur une cible intracellulaire. Il était néanmoins nécessaire de confirmer que COB223 n'agit pas sur la partie extracellulaire d'une protéine. Pour cela, nos collègues chimistes ont réalisé une molécule COB223 couplée à de l'albumine (COB-BSA (Bovine Serum Albumin)). Il était attendu que ce complexe volumineux ne pénètre pas dans les cellules.

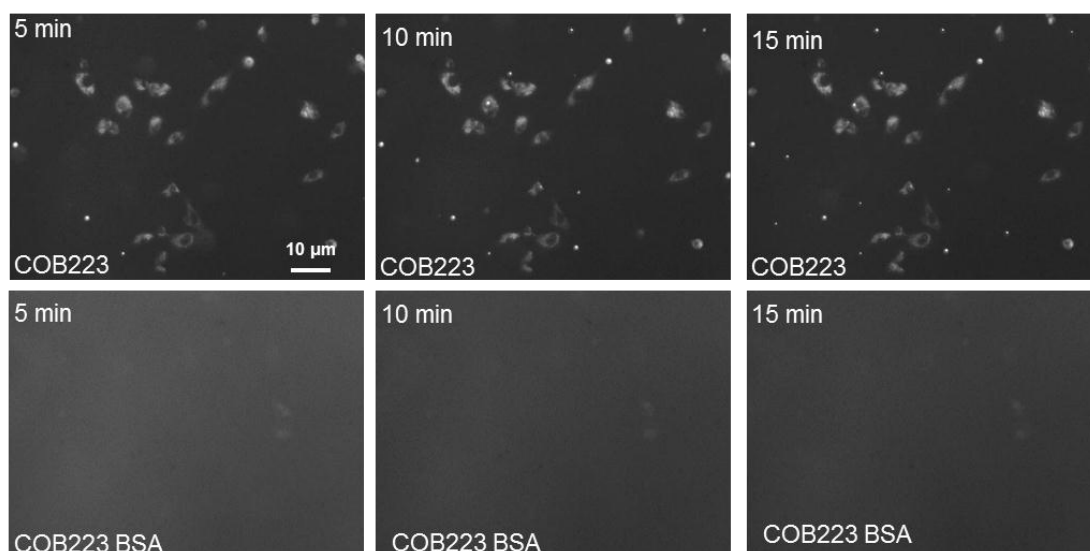
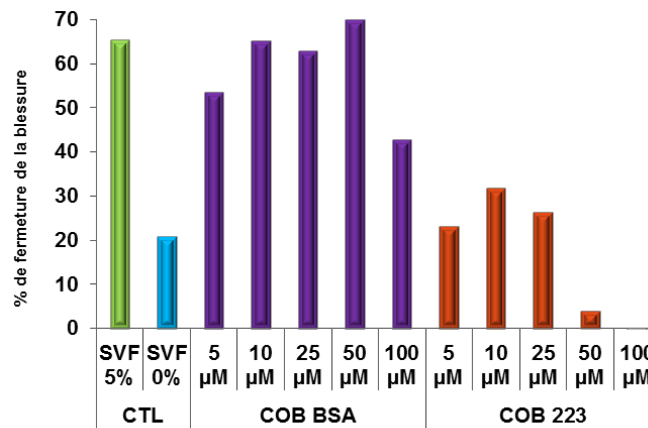


Figure 51 : Pénétration de COB223 versus COB223-BSA dans les cellules HUVEC.

Avec la même méthodologie que précédemment, j'ai observé l'entrée de COB223 versus COB223-BSA dans les cellules HUVEC. Comme attendu, COB223 s'internalise rapidement dans les cellules alors que COB-BSA est indétectable dans les HUVEC (Figure 51).

Ceci étant établi, j'ai étudié l'effet de ces deux composés sur le test de blessure sur des cellules HUVEC. Dans cette expérience (Graphique 8), COB223 inhibe fortement la fermeture de la blessure des cellules à de faibles concentrations. Dans le cas de la molécule COB-BSA, la fermeture de la blessure n'est absolument pas inhibée avec un taux de fermeture identique au contrôle, même à de fortes concentrations.



Graphique 8 : Effet de COB223 versus COB223-BSA sur la fermeture de blessure. Cellules HUVEC.

De cette expérience, j'ai conclu que COB223 doit pénétrer à l'intérieur des cellules pour avoir une activité anti-angiogène.

7.3 Recherche d'une compétition avec le transporteur des polyamines

La molécule COB223 possède plusieurs groupements amines primaires et secondaires. Elle peut donc être considérée comme une polyamine au même titre que les polyamines naturelles, la putrescine, la spermine et la spermidine, présentes dans tous les organismes. Les polyamines peuvent se lier à l'ADN, l'ARN, aux protéines, ainsi qu'aux polysaccharides et aux phospholipides. Les polyamines sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et l'angiogenèse [Thomas and Thomas, 2001].

Dans les cellules endothéliales, l'inhibition des polyamines induit l'augmentation de la survie en réponse à l'hypoxie en augmentant la réponse de la voie PI3K/AKT [Kucharzewska et al., 2009]. Les polyamines sont impliquées diversement dans la progression tumorale [Gerner and Meyskens, 2004].

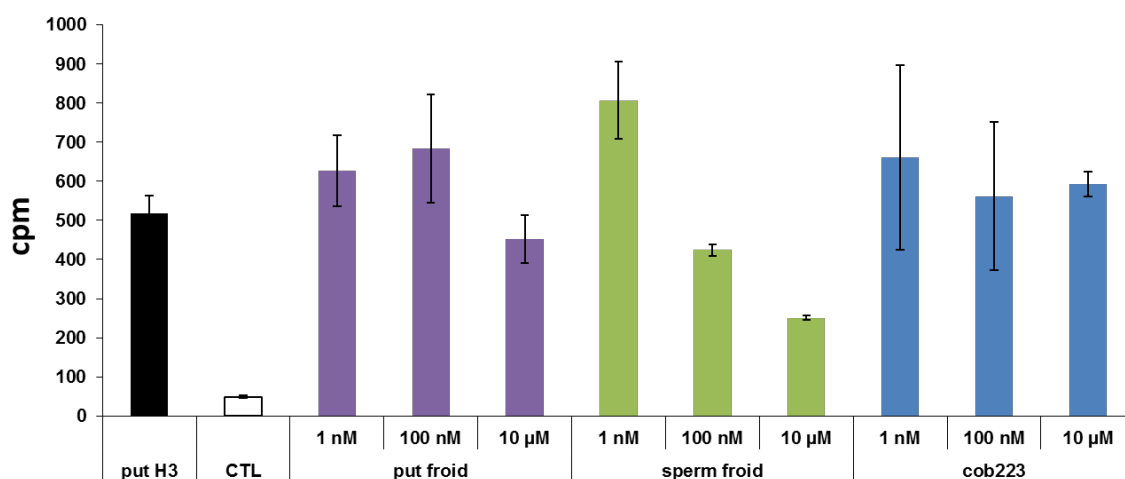
L'homéostasie des polyamines est dérégulée et les taux de polyamines intracellulaires ainsi que leur transport sont augmentés dans les cellules tumorales. Des stratégies anti-tumorales ciblant les polyamines [Casero and Marton, 2007] se sont développées [Svensson et al., 2008] où l'inhibition des polyamines par un analogue structural permet d'améliorer la réponse à un traitement anti-tumoral [Crew et al., 2008].

Dans ce contexte, nous avons envisagé que COB223 pouvait être un analogue structural des polyamines utilisant les mêmes mécanismes pour pénétrer dans les cellules. J'ai donc étudié si COB223 était un compétiteur des polyamines naturelles pour leur transporteur.

L'entrée de polyamines exogènes est régulée par un système de transport des polyamines. Les polyamines sont transportées activement à travers la membrane plasmique par des

transporteurs de cations (OCTs : Organic Cation Transporters) ou des transporteurs de solutés (SLCs : Solute Carriers) [Abdulhussein and Wallace, 2014] [Sala-Rabanal et al., 2013].

Les cellules HUVEC sont incubées à 4°C avec de la putrescine tritiée. La liaison est ensuite déplacée avec des concentrations croissantes de putrescine ou de spermine froides ou de COB223 (Graphique 9).



Graphique 9 : compétition de COB223 avec le transporteur des polyamines.
 put H3 : putrescine tritiée ; CTL : contrôle ; put : putrescine ; sperm : spermine

En présence de putrescine, et de spermine, on observe un déplacement de la liaison : la putrescine et la spermine sont capables de se lier au transporteur des polyamines. En revanche, COB223 ne peut pas déplacer la liaison putrescine tritiée-récepteur. COB223 n'est pas un compétiteur des polyamines naturelles et ne pénètre pas dans les cellules par leur transporteur.

De ces expériences, j'ai déterminé que COB223 agit de manière intracellulaire dans les cellules et j'ai exclu la possibilité d'une cible extracellulaire qui empêcherait par exemple la liaison d'un ligand à son récepteur.

7.4 Effet de COB223 sur la signalisation induite par le VEGF.

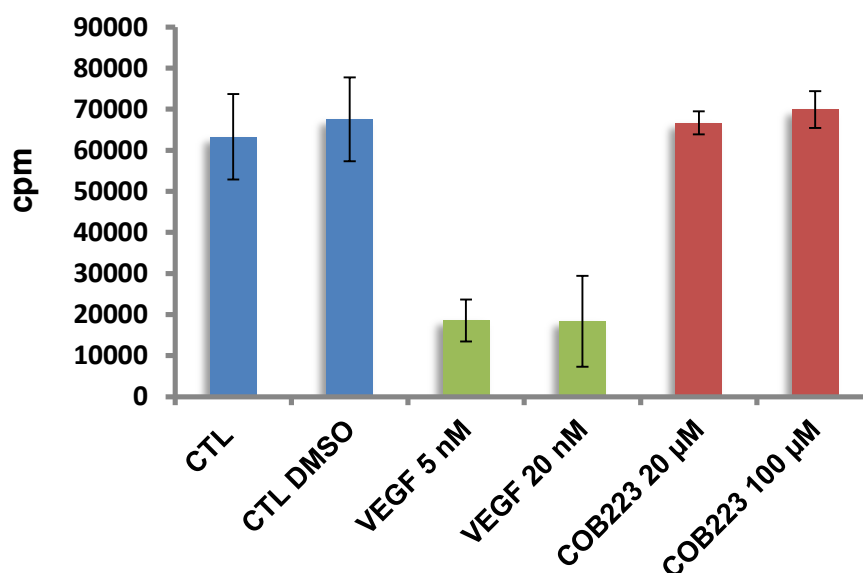
7.4.1 Effet de COB223 sur les kinases

De nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse sont des inhibiteurs de kinases. Nous avons évalué par un test d'activité *in vitro* réalisé par la société Millipore, si COB223 pouvait

être un inhibiteur de kinase. De par son effet sur la prolifération, nous l'avons testé sur les kinases du cycle cellulaire (CDK2/cyclinA, CDK2/cyclinE, CDK6/cyclinD3, CHK1 et CHK2) et de la voie de signalisation ERK (MEK1, CK2, FAK, MAPK1, MAPK2, c-Raf). Certains récepteurs tyrosine-kinase de facteurs de croissance sont également la cible d'inhibiteur et ont été inclus dans notre test (EGFR, FGFR2, récepteur à l'insuline, PDGFR β , TGFR1, Tie2, VEGFR2, Met (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes HGF)). Sur toutes ces kinases, COB223 n'agit pas comme un inhibiteur même à concentration élevée (S8 de l'article).

7.4.2 Test de compétition avec le VEGF

J'ai vérifié si COB223 entre en compétition avec le VEGF pour son récepteur. Pour cela, les cellules HUVEC sont incubées avec 0.2 nM 125 -VEGFA₁₂₁. La liaison du VEGF à son récepteur est efficacement déplacée par des doses importantes de VEGF froid. En revanche, cette liaison n'est pas affectée par COB223 à 20 ou 100 μ M (Graphique 10).



Graphique 10 : Compétition de COB223 avec le VEGF dans les cellules HUVEC.

De cette expérience, j'ai conclu que COB223 n'entre pas en compétition avec le VEGF sur son récepteur.

7.4.3 Effet de COB223 sur l'internalisation du VEGFR-2

Comme décrit en introduction, la signalisation des récepteurs et notamment celle du VEGFR-2 est en partie médiée par son internalisation. Pour connaître l'effet de COB223 sur l'endocytose du VEGFR-2 j'ai utilisé deux stratégies. La première consiste à observer en microscopie le devenir intracellulaire du VEGFR-2 après sa stimulation par le VEGFA-165. J'ai

étudié cette hypothèse par des expériences d'internalisation du VEGFR-2 dans des cellules endothéliales primaires en présence de COB223.

Dans cette expérience, les cellules HUVEC sont déprivées sur la nuit. Les cellules sont ensuite mises en présence d'un anticorps dirigé contre le domaine extracellulaire du VEGFR-2 pendant 30 minutes à 4°C. Cet anticorps a la particularité d'avoir un seul fragment Fc ce qui n'empêche pas la liaison du VEGF-A à son récepteur [Manickam et al., 2011]. Dans ces conditions, l'anticorps peut se lier au récepteur mais celui-ci ne s'internalise pas. Les cellules sont ensuite stimulées par du VEGF-A165 en présence ou non de COB223 et incubées à 37°C ce qui déclenche l'internalisation du complexe Ac-VEGFR-2/VEGFR.

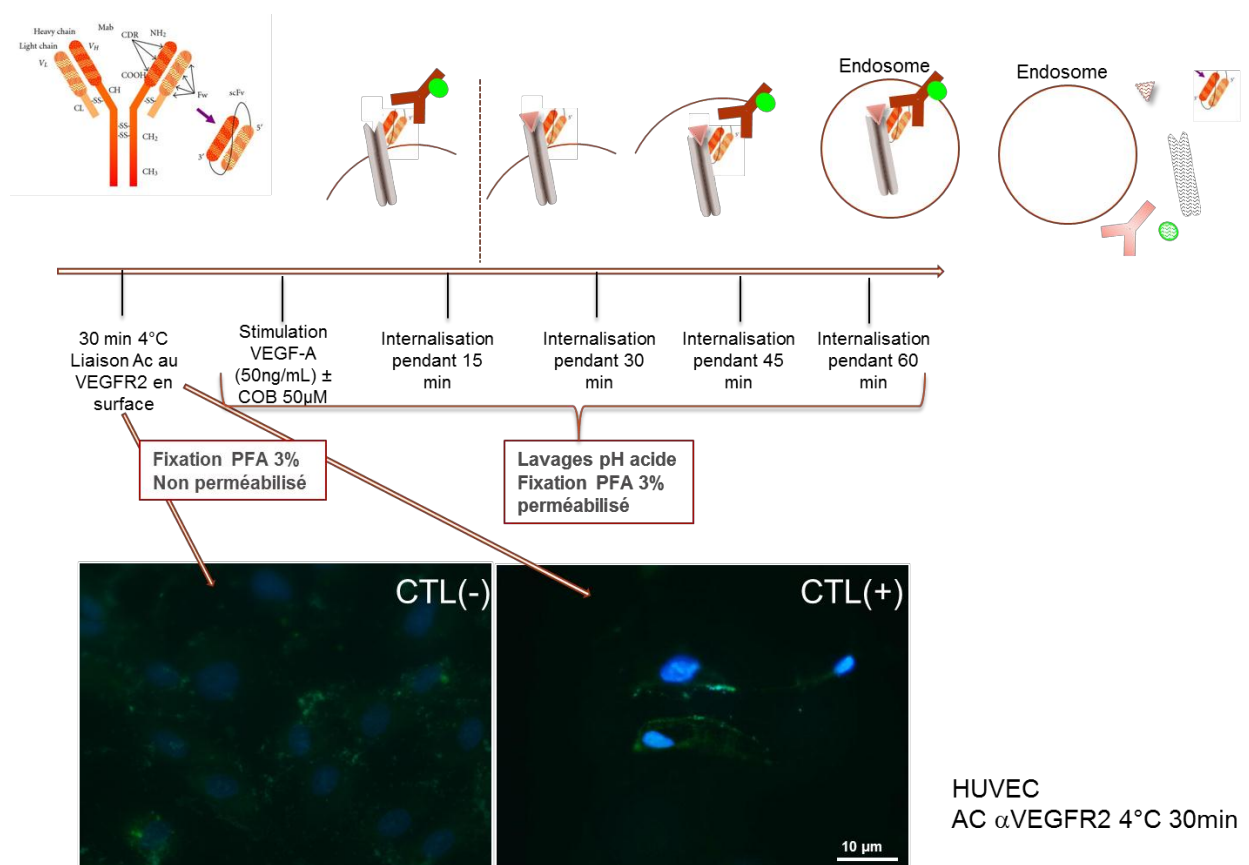


Figure 52 : Protocole d'étude de l'internalisation du VEGFR-2.

A l'arrêt de l'expérience, un lavage acide permet d'enlever le VEGFR-2 à la membrane, ce qui permet de n'observer que le VEGFR-2 intracellulaire. Les cellules sont fixées et un anticorps fluorescent dirigé contre le premier anticorps permet de visualiser la localisation du complexe Ac-VEGFR-2/VEGF. Lorsque ce complexe atteint les endosomes, il est détruit, la fluorescence disparaît (Figure 52).

Sur ces images, on voit à T0, un marquage membranaire du VEGFR-2. Après stimulation du VEGFR2 par le VEGFA, après 15 minutes, un marquage intracellulaire, ponctué ce qui suggère que le complexe Ac-VEGFR-2/VEGF est bien internalisé (Figure 53). A 30 min puis à 45 min,

aucun marquage intracellulaire n'est détectable. Le complexe est passé dans les endosomes où les partenaires se sont dissociés.

En revanche, en présence de COB223, j'ai observé un ralentissement de l'internalisation du VEGFR-2 (Figure 53) dans les cellules. A 15 min, un très faible marquage est visible ce qui suggère que le complexe Ac-VEGFR-2/VEGF est toujours fixé à la membrane ou peu internalisé. A 30 min, on observe un signal similaire à celui observé à 15 min dans la condition contrôle et qui perdure à 45 min en présence de COB223.

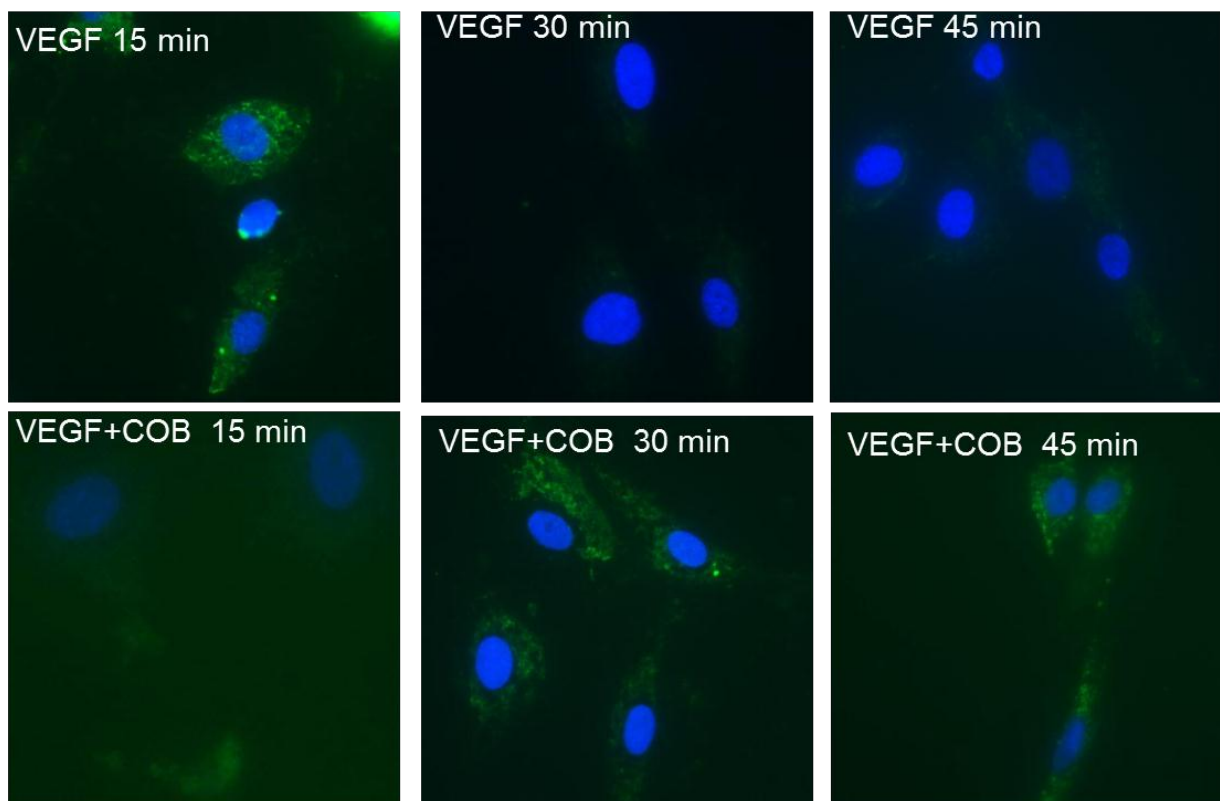


Figure 53 : Internalisation du VEGFR-2 dans les cellules HUVEC en présence de COB.

Ces résultats suggèrent que la cinétique d'internalisation du récepteur du VEGF pourrait être affectée par COB223. Des expériences complémentaires de colocalisation avec les vésicules d'internalisation seraient nécessaires pour connaître le devenir du VEGFR-2 dans ces conditions. Le récepteur pourrait être en effet engagé préférentiellement vers la voie de la dégradation via les vésicules contenant Rab7 au lieu de la voie du recyclage induite par les vésicules contenant Rab 5/4/11. Il est connu que les corécepteurs du VEGFR-2 sont décisionnels pour cette orientation. Par exemple, NRP1 oriente le trafic du VEGFR-2 vers les vésicules de recyclage [Ballmer-Hofer et al., 2011].

Ces expériences dont les résultats sont intéressants n'ont néanmoins pas été poursuivies dans un premier temps. Les effets observés sur le ralentissement du VEGFR-2 sont tardifs

par rapport à ceux que j'ai observés sur la voie de signalisation ERK (voir ci-après). Aussi, on peut penser que le ralentissement trafic du VEGFR-2 est une conséquence de l'action de COB223 et non pas son site d'action primaire.

7.4.4 Les partenaires du VEGFR-2 : cibles potentielles de COB223

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, il est connu que des protéines membranaires comme synectine, EphrineB2 ou Neuropiline-1 s'associent au VEGFR-2 et qu'elles sont indispensables à une bonne signalisation et internalisation de ce récepteur. COB223 pourrait interagir avec l'un de ces partenaires et perturber la signalisation du récepteur. J'ai mis au point des expériences de co-immunoprécipitation du récepteur VEGFR-2 phosphorylé sur la tyrosine 1175 et de l'EphrineB2, de la synectine ou de la Neuropiline-1. Il s'agit là de la 2^{ème} stratégie mise au point pour étudier le rôle potentiel de COB223 dans l'endocytose du VEGFR-2.

Les cellules HUVEC sont déprivées sur la nuit, puis stimulées par du VEGF pendant 15 ou 30 minutes en présence ou non de COB223. Des extraits protéiques totaux sont immunoprécipités avec l'anticorps anti-phospho Y1175-VEGFR-2 et analysés sur gel SDS-PAGE. Les immunoblots sont réalisés avec les anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt. Sur les extraits totaux avant immunoprécipitation (Input), nous n'avons pas observé d'effet notable de COB223 sur les protéines synectine, EphrineB2, NRP1 (Figure 54). L'activité de COB223 est confirmée par la diminution de la phosphorylation de ERK1/2 (voir chapitre suivant).

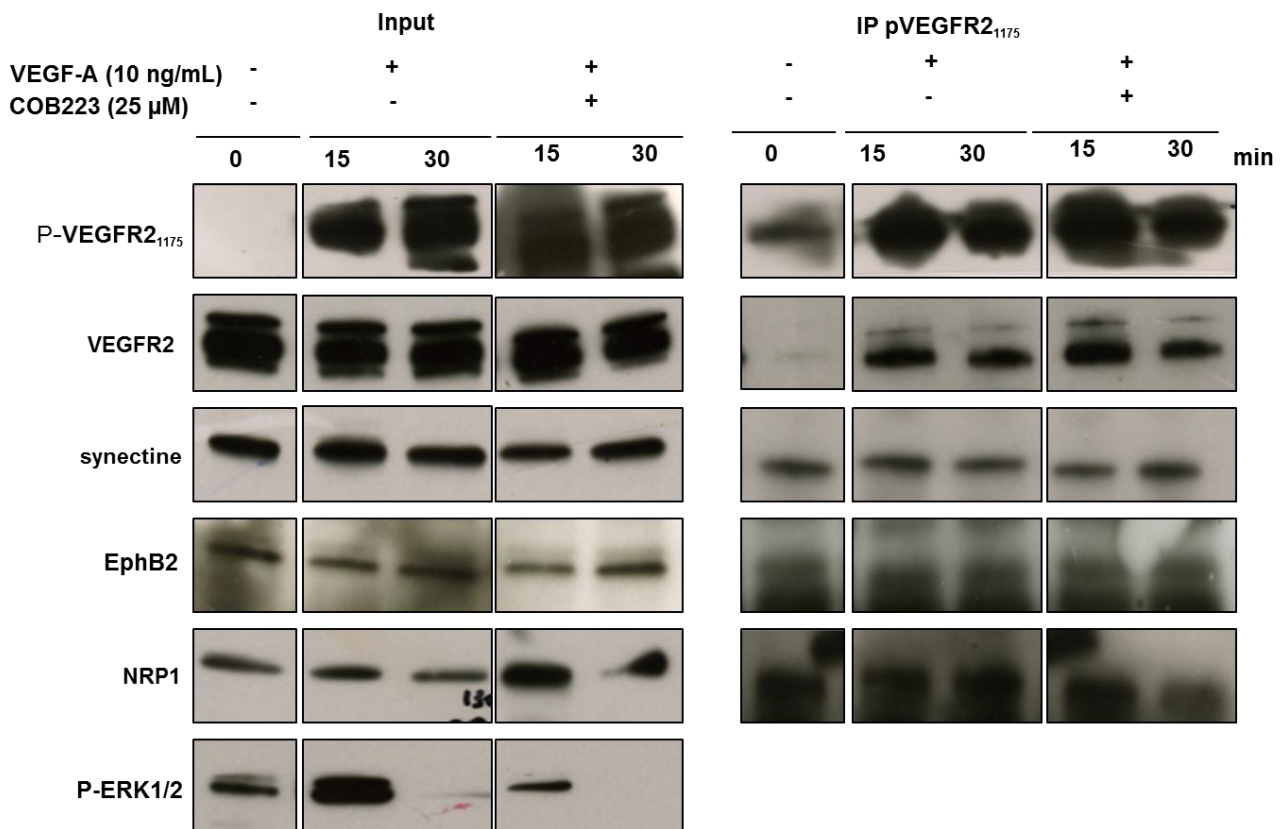


Figure 54 : Etude des partenaires d'internalisation du VEGFR-2.

Après immunoprécipitation, nous n'avons pas observé de différence d'association du VEGFR-2 avec ses partenaires. Ces expériences, délicates à mettre en œuvre, ne nous ont pas permis d'identifier une cible évidente pour COB223. C'est pourquoi, nous avons focalisé notre étude sur la voie de signalisation pour laquelle l'inhibition de phospho-ERK par COB223 est reproductible.

7.4.5 Etude de la voie de signalisation ERK

Dans ce paragraphe, j'apporterai des résultats complémentaires à ceux décrits dans la publication sur l'étude de la voie de signalisation de ERK et notamment sur l'effet de COB223 sur la phosphorylation de Raf.

Dans les tests d'angiogenèse *in vitro* et de tumorigenèse *in vivo*, j'ai constaté que COB223 a un effet anti-prolifératif sur les cellules. Lors de la recherche du mécanisme d'action, il était nécessaire de vérifier quelles étaient les voies de signalisation affectées par COB223. La voie ERK est la voie principale impliquée dans la prolifération dans un contexte d'angiogenèse. Afin de faciliter la lecture de ce chapitre, la Figure 55 ci-dessous reprend les différents acteurs mis en jeu dans la signalisation ERK.

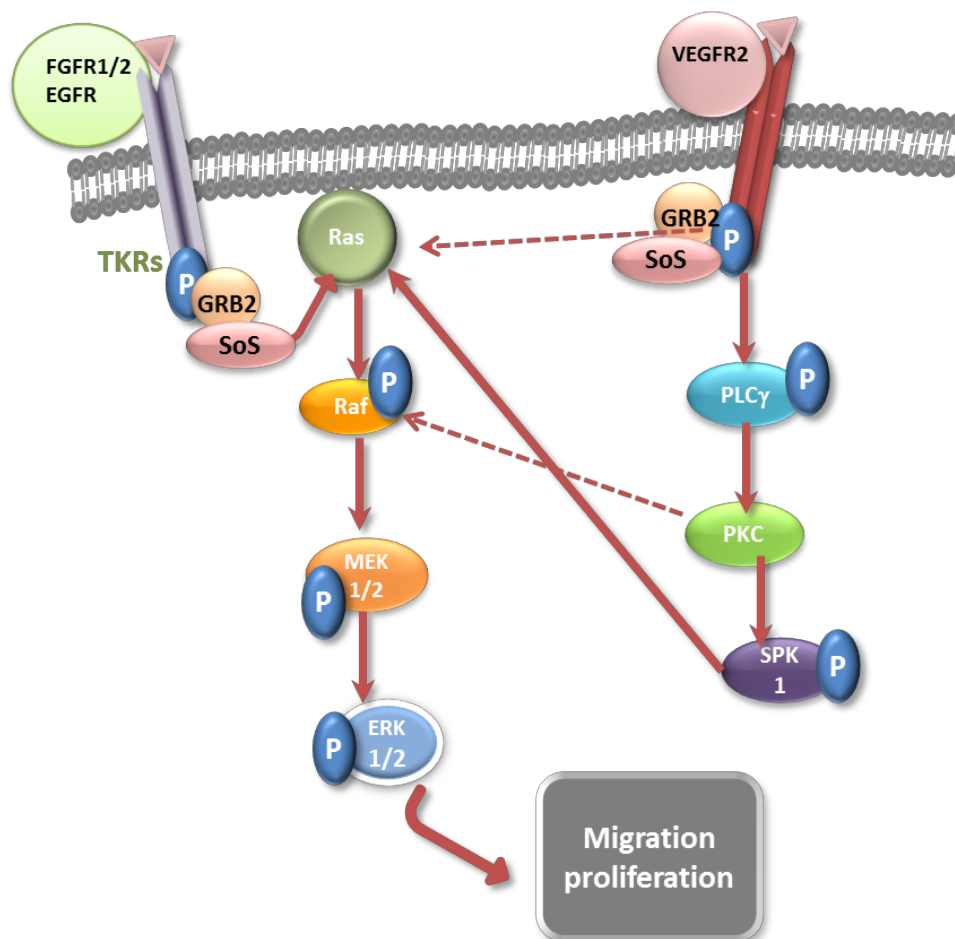


Figure 55 : Schéma de la voie de signalisation ERK induite par le VEGF-A et FGF-2. Les flèches pleines indiquent les voies canoniques décrites dans la littérature. Les flèches en pointillées indiquent les voies plus contestées d'activation de Ras et Raf par le VEGFR-2.

- Résultats préliminaires

Afin de comprendre le mécanisme d'action de COB223, j'ai dans un premier temps, cherché à déterminer la ou les voies de signalisation activées par le VEGF-A qui pouvait être modifiée en accord avec les phénotypes observés. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux voies ERK (p42/p44-MAPK), p38-MAPK, Src et à l'apoptose.

✓ **ERK1/2**

J'ai montré une inhibition significative de la phosphorylation de ERK1/2 induite par le VEGF-A, le FGF-2 et le sérum dans des cellules HUVEC préalablement déprivées et incubées avec COB223 et ce, de manière dose-dépendante (Figure 56, Graphique 13). Ceci est en corrélation avec les diminutions de phosphorylation de ERK1/2 et de phospho-histone H3 observées dans les coupes de tumeurs traitées.

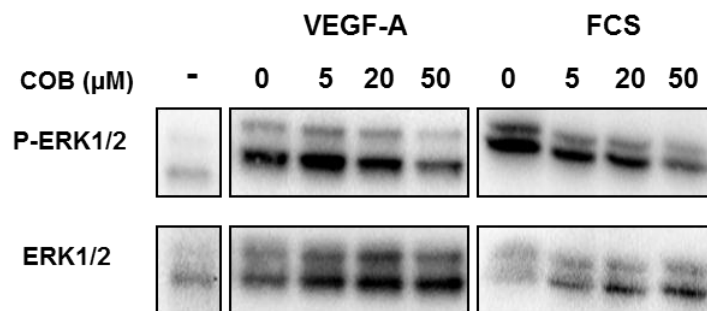
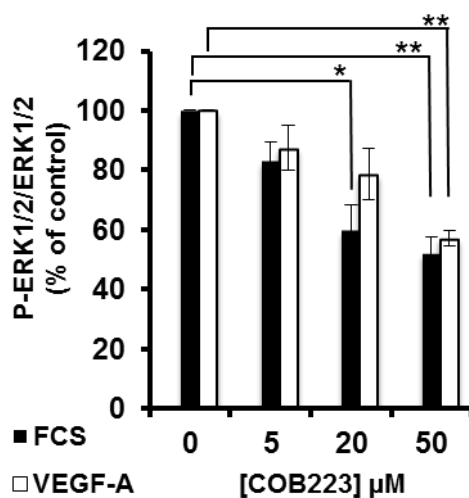


Figure 56 : Effet de COB223 sur la voie de signalisation ERK dans les HUVEC.



Graphique 11 : Quantification des Western Blots de la phosphorylation de ERK1/2.

De manière intéressante, j'ai également observé que dans les cellules 3T3 stimulées par le FGF-2 et soumises à COB223, aucune modification de la phosphorylation de la voie ERK1/2 n'est observable (Figure 57, Graphique 12).

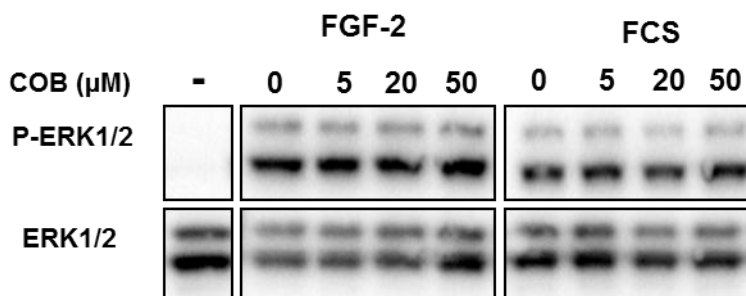
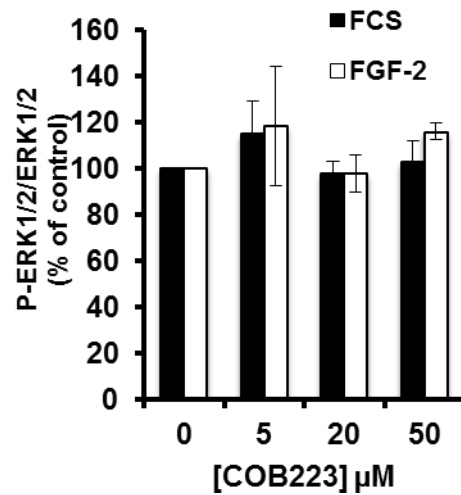


Figure 57 : Effet de COB223 sur la voie ERK dans les cellules 3T3.



Graphique 12 : Quantification des Western Blots P-ERK1/2 dans les 3T3.

Ces résultats sont cohérents avec l'insensibilité de ces cellules au composé aussi bien sur la migration, la prolifération ou encore le fait que COB223 semble pénétrer difficilement dans les fibroblastes 3T3.

✓ **p38-MAPK**

Parallèlement, j'ai étudié la phosphorylation de la voie p38-MAPK et observé qu'elle n'est pas modifiée (Figure 58, Graphique 13) même en présence de concentrations importantes de COB223. L'action de COB223 semble donc relativement spécifique sur la voie ERK1/2.

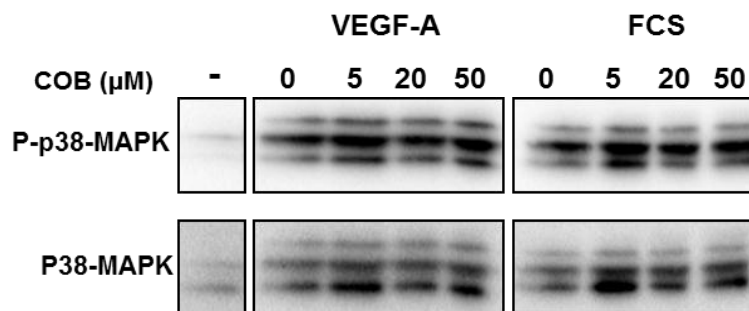
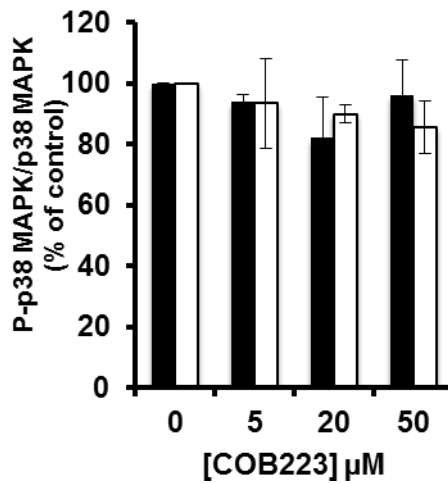


Figure 58 : Effet de COB223 sur la voie de signalisation p38-MAPK dans les HUVEC.



Graphique 13 : Quantification des Western Blots de la phosphorylation p38-MAPK.

✓ **Src**

De la même manière, je n'ai pas observé pas d'altérations de la phosphorylation de Src (Figure 59). Ce résultat est cohérent avec la littérature où il est décrit que l'activation de Src est impliquée dans le recrutement de la VE-Cadhérine et le remodelage vasculaire mais n'affecte pas la prolifération des cellules endothéliales.

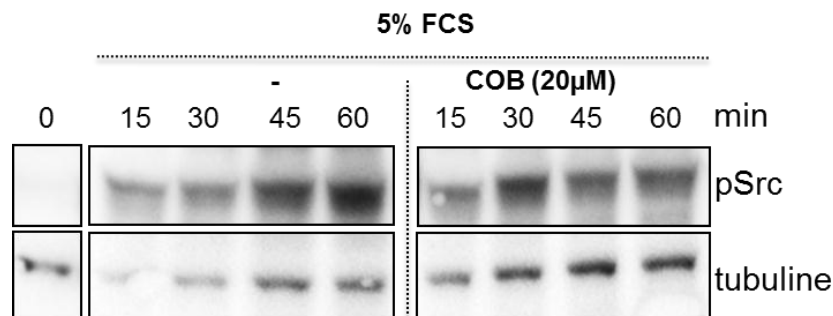


Figure 59 : Effet de COB223 sur la phosphorylation de Src dans les HUVEC.

✓ **AKT/PKB-apoptose**

L'étude de l'apoptose par un test Annexin-FITC sur les cellules HUVEC et LLC/2 a montré que COB223 n'augmentait pas l'apoptose dans ces cellules (Tableau 10). Ces résultats sont compatibles avec ceux observés en immunohistochimie sur les coupes de tumeurs où un marquage TUNEL n'a pas montré d'augmentation de l'apoptose dans les tumeurs traitées par COB223.

COB (μM)	Annexin-FITC en %		
	0	5	20
HUVEC	4,78	3,88	3,88
LLC	2,47	2,23	2,98

Tableau 10 : test Annexin-FITC sur les cellules HUVEC et LLC/2 en présence de COB223.

Ces résultats sont confirmés sur des extraits protéiques d'HUVEC analysés par Western Blot. Dans cette expérience, les cellules sont préalablement déprivées puis stimulées par du sérum ou du VEGF-A en présence de concentrations croissantes de COB223 (Figure 60).

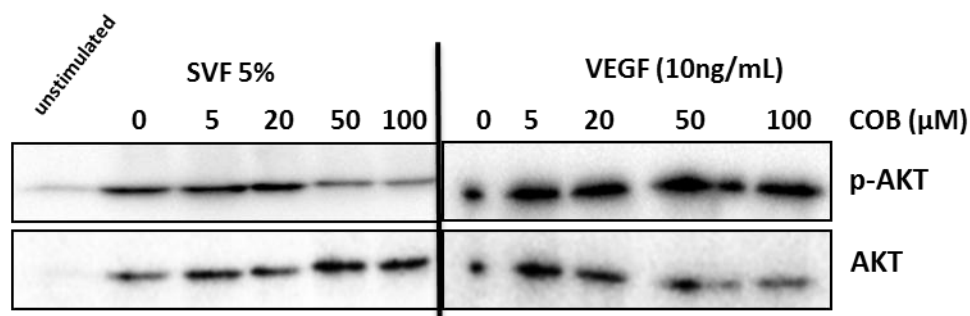


Figure 60 : Analyse par Western Blot de la phosphorylation d'AKT dans les HUVEC.

La phosphorylation d'AKT n'est pas donc modifiée en présence de COB223.

- Conclusion intermédiaire

De par l'ensemble de ces résultats, il était envisageable que le mécanisme d'action de COB223 passe par une modification de la régulation de la voie ERK. C'est pourquoi, nous avons détaillé l'effet de COB223 sur les différents effecteurs de cette voie.

- ✓ **Effet de COB223 sur les phosphorylations du VEGFR-2**

J'ai montré que COB223 n'empêche pas la liaison de VEGF-A à son récepteur. J'ai voulu déterminer si COB223 pouvait affecter les phosphorylations du récepteur induites par son ligand sur différents résidus tyrosine. Par la même approche en Western Blot, j'ai montré que COB223 n'affecte pas la phosphorylation de deux résidus tyrosine du récepteur VEGFR-2 : Y1175 et Y1214 (Figure 4A, 4B de l'article et Figure 61). Y1214 est le site impliqué dans l'activation de la voie p38-MAPK alors que Y1175 est le site impliqué dans la voie ERK.

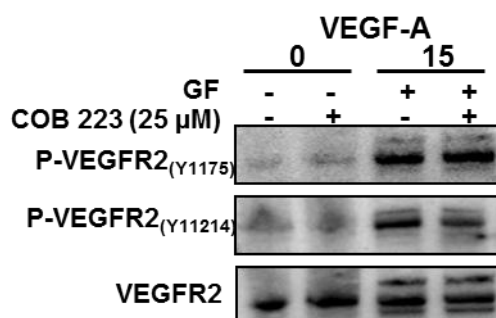


Figure 61 : Effet de COB223 sur la phosphorylation du VEGFR-2 dans les HUVEC.

Nous n'avons observé de différence de phosphorylation sur ces deux sites qui expliquerait la différence d'action sur la voie p38-MAPK ou ERK. COB223 agit sur la voie ERK indépendamment d'un effet sur la phosphorylation du récepteur.

✓ **Effet de COB223 sur la PLC γ et la PKC**

PLC γ est l'effecteur situé en aval du VEGFR-2. Par la même approche de Western Blot, j'ai montré que COB223 n'affectait pas sa phosphorylation (Figure 62 et Figure 5A de l'article).

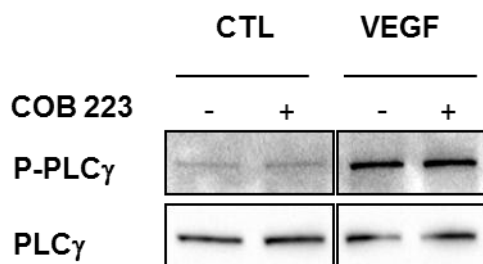


Figure 62 : Effet de COB223 sur la phosphorylation de la PLC γ dans les HUVEC.

La voie de signalisation ERK activée par le VEGF passe par des effecteurs différents des autres récepteurs à tyrosine kinase. L'implication de la voie d'activation GRB2-SOS est en effet discutée, et l'activation de Ras par la PKC semble être plus communément admise. En utilisant des inhibiteurs de la PKC (Gö6973 et Gö6983) j'ai confirmé que l'activation de ERK1/2 par le VEGF est consécutive à l'action de la PKC (Figure 63 et Figure S9B de l'article). Par contre, les inhibiteurs de la PKC ne diminuent que partiellement l'activité de ERK induite par le FGF-2 (Figure S9B de l'article).

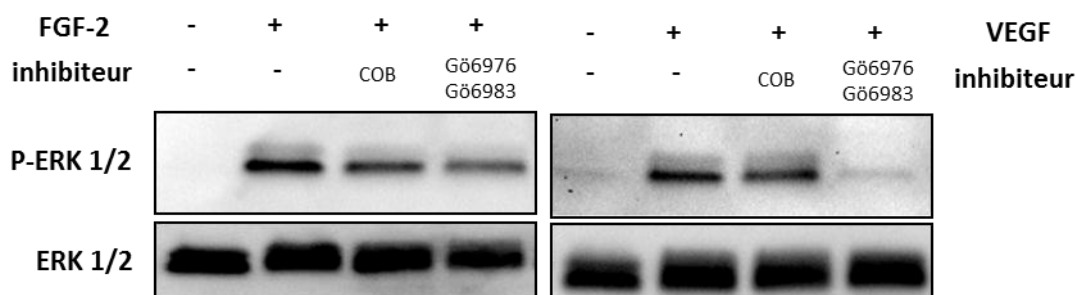


Figure 63 : Implication de la PKC dans la voie ERK induite par le VEGF-A dans les HUVEC.

Par ailleurs, lorsque la PKC est directement activée sous l'effet de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate), COB223 diminue partiellement la phosphorylation de ERK (Figure 64 et Figure S9 de l'article). COB223 agit donc en aval de l'activation de PLC γ et de la PKC et en amont de ERK.

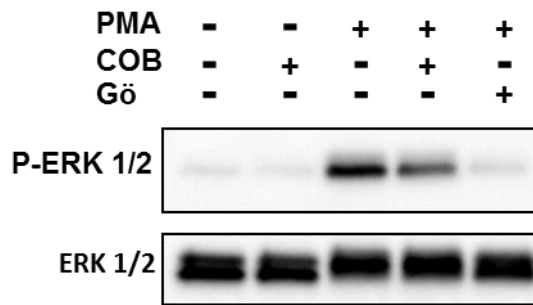


Figure 64 : Effet de COB223 sur la voie ERK en aval de la PKC dans les HUVEC.

COB223 pourrait être un inhibiteur de la PKC. Néanmoins, sa structure n'est pas apparentée à un inhibiteur de kinase. Nous avons vérifié ce point par un test d'inhibition de kinase (Millipore) sur les quatre isoformes communément trouvées dans les HUVEC : PKC α , PKC β_1 , PKC β_{II} , et PKC ζ .

✓ Effet de COB223 sur MEK

Afin d'affiner le site d'action de COB223 dans voie ERK, nous nous sommes intéressés à l'effecteur en amont de ERK1/2: MEK. La phosphorylation de la voie ERK1/2 est induite dans les HUVEC par le VEGF-A, le FGF-2 ou le sérum. Par la même stratégie en Western Blot, j'ai montré que COB223 inhibe la phosphorylation de MEK induite par ces trois effecteurs (Figure 65, Graphique 14 et Figure 4A, 4B de l'article).

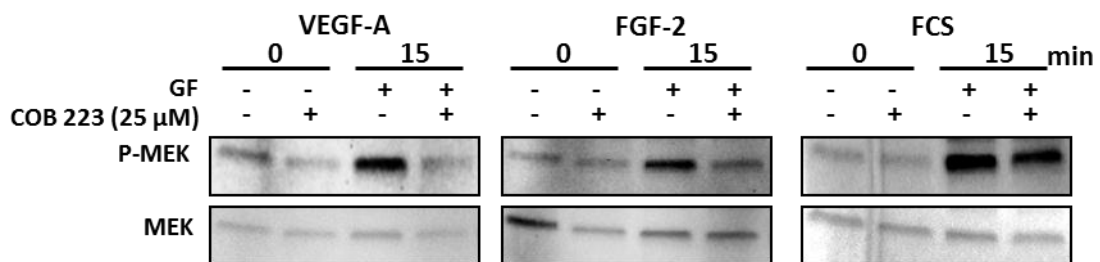
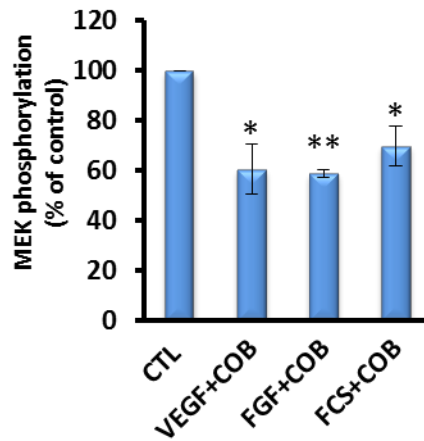


Figure 65 : Effet de COB223 sur MEK dans les HUVEC.



Graphique 14 : Quantification des Western Blots de la phosphorylation MEK.

Les résultats obtenus sont similaires quel que soit l'inducteur. Ces expériences nous ont permis de déterminer que COB223 agissait en amont de MEK et en aval de la PKC. Nous nous sommes alors intéressés à l'effecteur en amont de MEK : Raf.

✓ **Effet de COB223 sur Raf**

Les cellules CCL-39 Raf-ER exprime une forme constitutivement active de Raf sous l'induction de l'oestradiol. Dans ces cellules, COB223 n'inhibe pas la phosphorylation de ERK1/2 (Figure 66 et Figure 5C de l'article). L'effet de COB223 est donc en amont de Raf. Nous avons voulu savoir si COB223 affectait la phosphorylation de Raf endogène. Les cellules HUVEC, déprivées sur la nuit, sont ensuite stimulées par du VEGF-A (Figure 67 et Figure 5A de l'article) ou avec 5% de sérum pendant 15 minutes en présence ou non de COB223. Les extraits protéiques sont analysés en gel SDS-PAGE après incubation avec les différents anticorps.

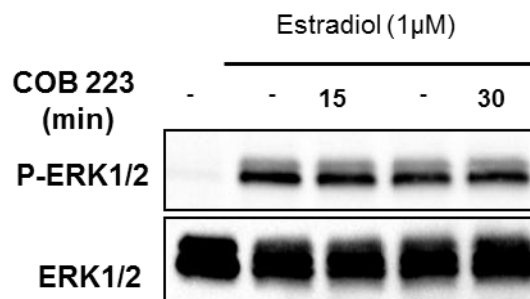


Figure 66 : Effet de COB223 sur la phosphorylation ERK1/2 induite par l'estradiol dans les cellules CCL-39 Raf-ER.

Comme décrit en introduction, dans le cycle d'activation de Raf, deux sérines jouent un rôle important. Il s'agit de la Sérine259, phosphorylée dans la forme inactive de Raf. C'est sa déphosphorylation qui permet le changement de conformation de Raf permettant sa phosphorylation par des kinases (CK2 (Caséine Kinase 2), PAK...), ou même son

autophosphorylation. Lors du retour à la forme inactive de Raf, la Sérine259 est à nouveau phosphorylée.

Je présente ici les résultats obtenus lorsque les cellules sont stimulées avec le sérum, similaires à ceux obtenus en présence de VEGF (Figure 67 et 5A de l'article).

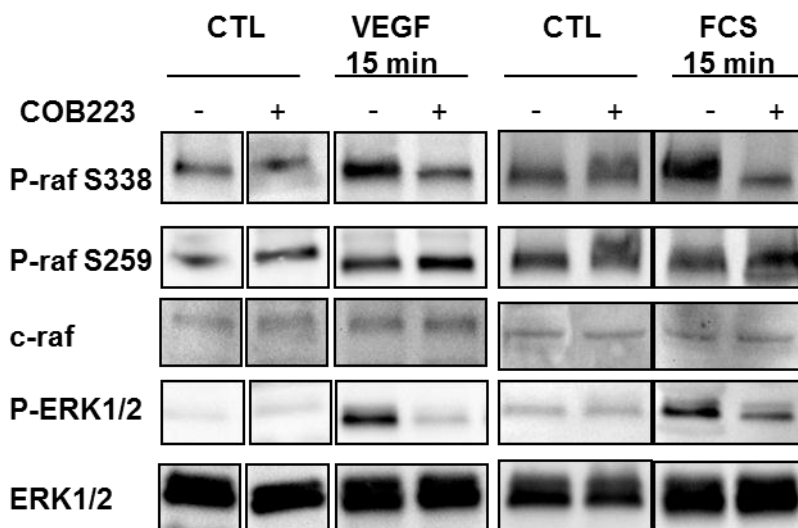


Figure 67 : Effet de COB223 sur la phosphorylation de Raf dans les HUVEC.

On observe que la Sérine259 est phosphorylée à l'état basal ce qui est cohérent avec un état inactif de Raf. On note une légère diminution de la phosphorylation lorsque les cellules sont stimulées par le sérum et une augmentation de la phosphorylation de la Sérine259 en présence de COB223. Cependant, en quantification, ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Parallèlement, la Sérine338 est connue pour être phosphorylée lorsque Raf est activé. Dans notre modèle, on observe bien une forte augmentation de la phosphorylation de la Sérine338 en présence de sérum et de VEGF-A. En présence de COB223, on observe une diminution significative de la phosphorylation de la Sérine338.

L'efficacité de COB223 est vérifiée par sa capacité à inhiber la phosphorylation de ERK1/2.

Ces résultats, similaires à ceux obtenus lorsque les cellules sont stimulées avec le VEGF-A prouvent que COB223 perturbe la voie ERK, en amont de Raf.

✓ Effet de COB223 sur Ras

Pour évaluer l'effet de COB223 sur Ras, j'ai utilisé des expériences de Ras Pull-down. Dans ce test, une protéine de fusion contenant le domaine de fixation de Ras issu de la protéine Raf (domaine RBD : Ras Binding Protein) est fixée sur une résine sépharose. Cette protéine n'est capable de lier que le Ras activé. Un extrait cellulaire d'HUVEC traitées ou non avec du COB223 est déposé sur la colonne. Après élution de la colonne et dépôt sur un gel SDS-PAGE, un anticorps spécifique permet de visualiser le Ras actif de chaque échantillon par

Western Blot. Malheureusement, les résultats obtenus par cette méthode ont été peu reproductibles et n'ont pas permis d'apporter une réponse précise. Les problèmes que j'ai rencontrés peuvent être dus d'une part au fait que l'activation de Ras est rapide et transitoire, et d'autre part que les HUVEC sont des cellules primaires qui gardent une certaine hétérogénéité dans leur réponse aux stimuli.

Pour contourner ce problème, j'ai utilisé des cellules MCF10A-RasG12V qui surexpriment de manière constitutive Ras activé en l'absence de stimulus. Dans ces cellules, COB223 n'est pas capable d'inhiber la phosphorylation de ERK1/2 (Figure 68 et Figure 5B de l'article).

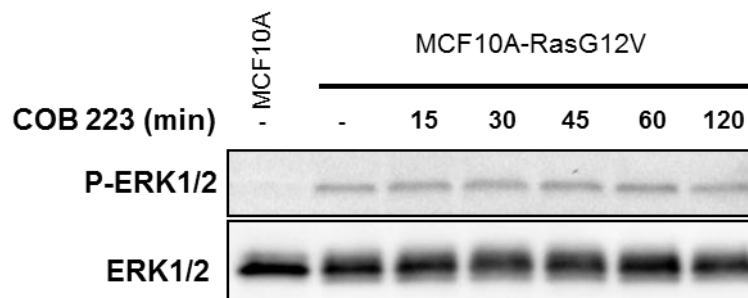


Figure 68 : Effet de COB223 sur la phosphorylation ERK1/2 dans les cellules MCF10A-RasG12V.

De cette expérience, j'ai pu conclure que la cible de COB223 est en amont de Ras activé et en aval de la PKC.

✓ Conclusion

Nous avons vu que la signalisation du VEGF présente de nombreuses caractéristiques communes celle des récepteurs tyrosine-kinases d'autres facteurs de croissance, mais quelques différences existent, notamment au niveau de l'activation de Ras où le mécanisme n'est pas entièrement élucidé. Dans cette étude, j'ai montré que la cible de COB223 est un acteur de la voie de signalisation ERK commune au récepteur VEGFR-2, et aux autres récepteurs tyrosine-kinases activés par le FGF-2 ou le sérum. De ces expériences, j'ai conclu que la cible de COB223 est en aval de la PKC et en amont de Ras (Figure 69).

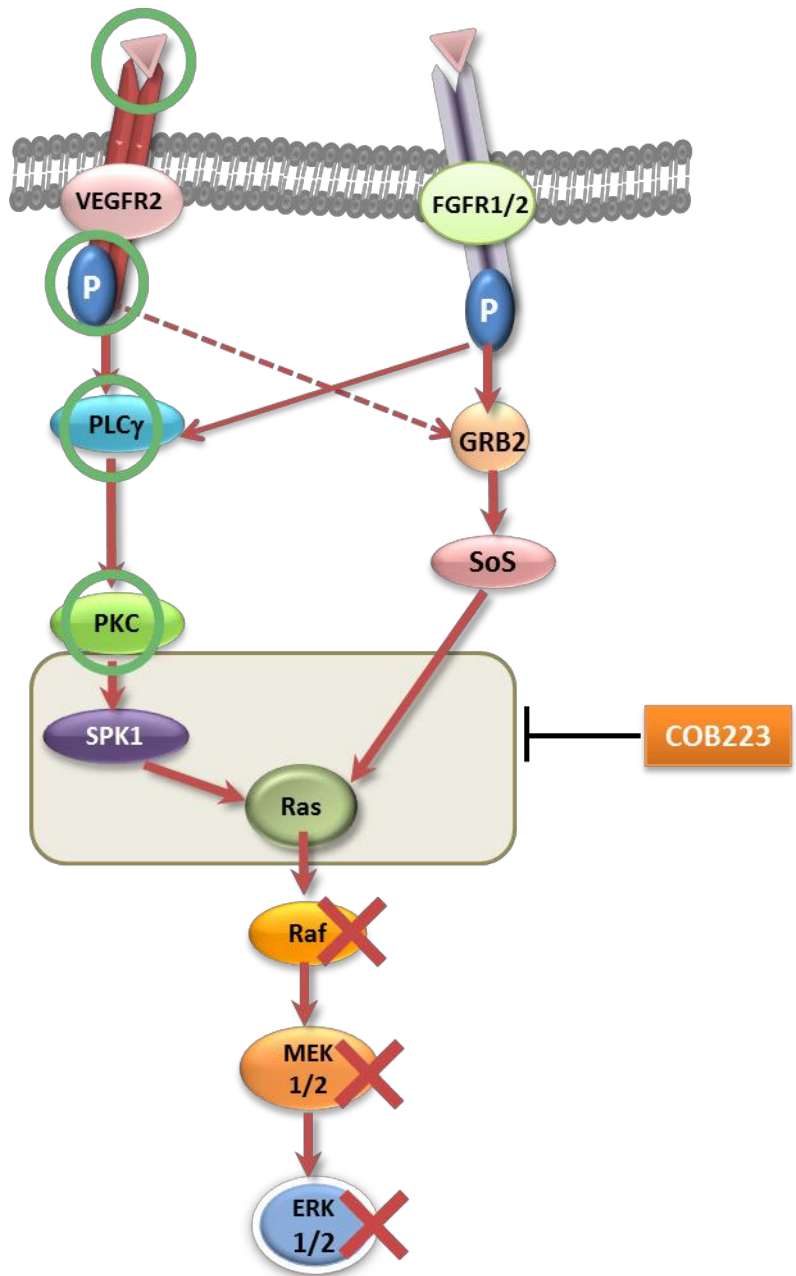


Figure 69 : Schéma récapitulatif de l'effet de COB223 sur la voie ERK.

Les flèches rouges pleines indiquent les voies de signalisation que j'ai établies. Les croix rouges indiquent les effecteurs de la voie de signalisation dont l'activité est diminuée par COB223. Les cercles verts indiquent les intermédiaires non affectés par COB223. La zone grisée indique l'intervalle d'activité que j'ai déterminé pour COB223.

DISCUSSION

7.5 Conclusions

L'objectif de ce travail était d'identifier un nouveau composé chimique à activité anti-angiogène, d'évaluer son activité anti-tumorale *in vivo*, et de déterminer son mécanisme d'action. J'ai pu dans un premier temps, d'adapter un test d'angiogénèse *in vitro* aux contraintes du criblage robotisé an plaque 96 puits. Puis, j'ai identifié une famille de molécules agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales. Nos collègues chimistes ont ensuite synthétisé des analogues structuraux afin de permettre une étude de relation structure-activité. Une molécule leader COB223 s'est révélée très efficace inhibant la fermeture d'une blessure endothéliale avec une IC50 de l'ordre de 5 à 20 μM . Il s'agit d'une molécule polyamine dansylée.

L'activité de cette molécule a été confirmée *in vitro* sur des tests d'angiogénèse en trois dimensions, puis sur un modèle d'angiogénèse *in vivo*. Dans chaque cas, j'ai pu constater que COB223 inhibait l'angiogénèse de manière significative. Ces premiers résultats encourageants, nous ont amenés à étudier le potentiel anti-tumoral de COB223. J'ai implanté des cellules TSA-luc ou LLC/2-luc dans des souris Nude en sous-cutanée et mesuré la croissance tumorale. Dans ces modèles de xénogreffe, COB223 était injecté en intra-péritonéal à des concentrations de 4 et 16 mg/kg tous les deux jours. Ce sont des doses très faibles par rapport à celles utilisées pour d'autres anti-angiogènes (40 mg/kg/jour pour le Sunitinib [Kodera et al., 2011] ; 15 à 30 mg/kg/jour pour le Sorafenib [Wilhelm et al., 2008]). La croissance tumorale est significativement réduite chez les souris traitées. Et de manière très intéressante, les souris n'ont présenté aucun signe d'intolérance au traitement. Les coupes histologiques des tumeurs ont montré des différences significatives dans la vascularisation, (diminution du marquage CD31, du nombre de vaisseaux), mais aussi une augmentation de la taille des nécroses et une diminution du nombre de cellules en prolifération dans les tumeurs traitées. A contrario, le niveau d'apoptose restait équivalent.

A ce stade, un brevet a été déposé en 2011 sur cette molécule et sa famille. Une extension PCT a été obtenue en janvier 2012.

J'ai ensuite voulu déterminer le mécanisme d'action et identifier la cible moléculaire de COB223. Des tests préliminaires sur la prolifération et le cycle cellulaire ont montré que COB223 inhibe la prolifération des cellules endothéliales et tumorales en bloquant le cycle en phase G1. J'ai également observé que COB223 inhibe la phosphorylation de ERK1/2 induite par le VEGF-A, le FGF-2 et le sérum. La diminution de la phosphorylation de ERK1/2 a également été observée *in vivo* en immunohistochimie au niveau de la marge des tumeurs.

Dans les cellules endothéliales, les facteurs de croissance VEGF-A ou le FGF-2 se lient sur leurs récepteurs tyrosine-kinase, qui, en réponse, activent la voie ERK, responsable de la prolifération cellulaire.

La signalisation du récepteur du VEGF étant bien documentée, et de nombreux outils étant disponibles pour son étude, nous avons étudié l'effet de COB223 sur cette voie.

✓ Voie ERK induite par le VEGF-A

Bien que très étudiée, certaines parties de la voie de signalisation du VEGFR-2 restent à ce jour méconnues, et des controverses subsistent. Dans la littérature, l'implication de certaines protéines dans la voie de signalisation ERK n'est pas parfaitement établie. C'est le cas notamment pour l'activation de Ras. Pour certains groupes [Meadows et al., 2001; Shu et al., 2002], l'activation de Ras par le VEGFR dans les HUVEC serait liée au phénotype angiogène c'est-à-dire quand les cellules endothéliales sont en prolifération. Dans cette situation, Ras serait activé par une voie classique GRB2-SOS. D'autre part, des voies ras-indépendantes, ont également été décrites dans des cellules endothéliales sinusoidales du foie [Takahashi et al., 1999]. Dans ce modèle, la PKC activerait directement Ras sans impliquer GRB2 et SOS. Enfin, un autre groupe a décrit que la PKC phosphoryle directement Raf [Kolch et al., 1993].

En conséquence, le mécanisme par lequel le VEGFR-2 active Ras n'est à ce jour pas totalement élucidé. Aussi, j'ai dans un premier temps, déterminé les acteurs de la voie ERK dans notre modèle cellulaire. Dans les HUVEC, l'inhibition de la PKC abolit totalement la réponse ERK au VEGF. J'ai ainsi confirmé le rôle essentiel de la PKC.

Nos résultats sont en faveur d'une activation de la voie ERK où Ras n'est pas directement activé par le VEGF mais indirectement par la voie PLC γ -PKC et SPK1. Ces expériences nous ont permis de proposer un mode d'activation de la voie ERK dans les HUVEC schématisé dans la Figure 70.

J'ai établi que COB223 inhibe la phosphorylation de MEK et ERK1/2 induite par les facteurs de croissance. Cependant, COB223 n'affecte pas la phosphorylation du VEGFR-2 et de PLC γ . Sur la base de ces résultats, j'ai établi que COB223 agissait en aval de PLC γ et en amont de MEK.

Pour détailler plus précisément le mode d'action de COB223, j'ai ensuite utilisé des cellules CCL19-Raf-ER où Raf est inductible sous le contrôle d'un promoteur à l'estrogène. Dans ces cellules, COB223 n'inactive pas la phosphorylation ERK. Son action est donc en amont de Raf.

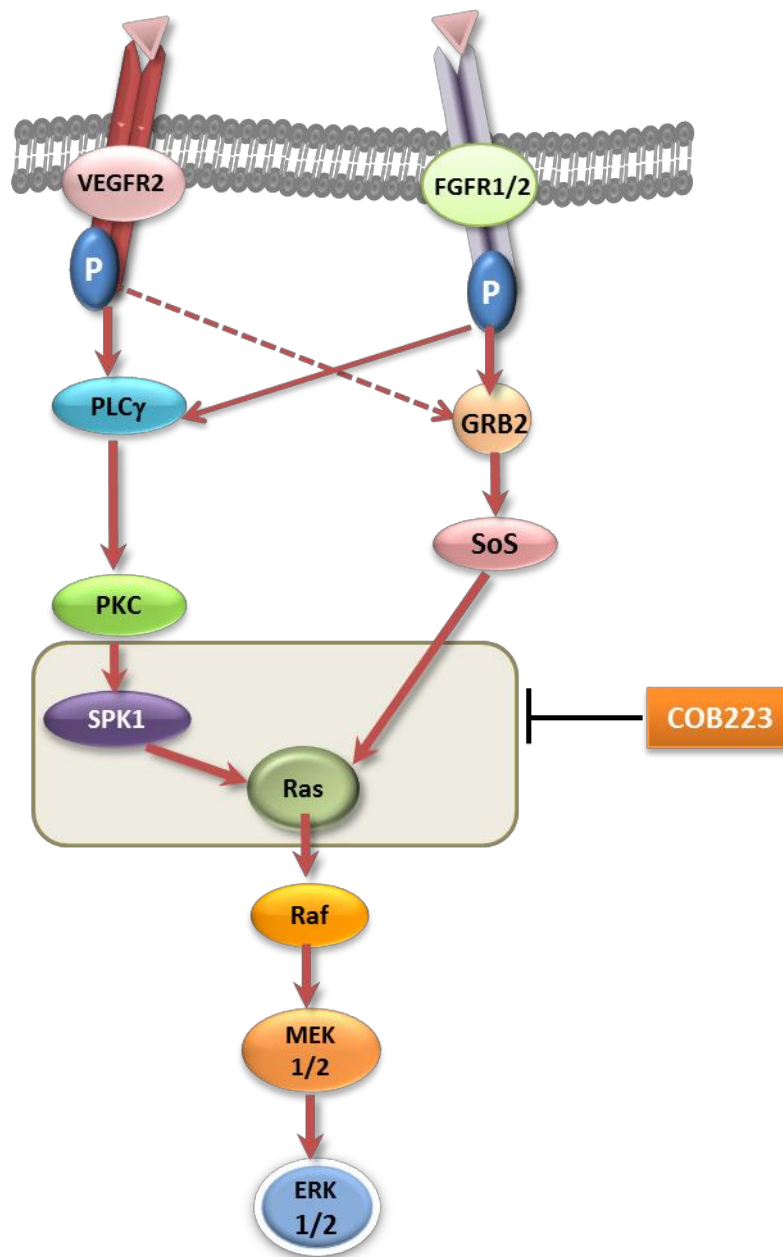


Figure 70 : Voie d'activation ERK par le VEGF-A et le FGF-2 dans les HUVEC.
 Dans la zone grisée, le site d'action de COB223.

Ces résultats confirment ceux obtenus sur les cellules HUVEC où l'activation de Raf a été évaluée par sa phosphorylation sur la sérine 338. Dans les cellules endothéliales, COB223 inhibe cette phosphorylation. Cela confirme que l'effet de COB223 se situe en amont de Raf et en aval de la PLCγ.

Entre la PLCγ et Raf, plusieurs effecteurs (Ras, PKC, SPK1) pourraient être la cible de COB223. Nous souhaitons évaluer si COB223 inhibe l'activation de Ras qui se situe en amont de Raf. Pour étudier cette possibilité, j'ai essayé de mettre aux points des expériences de mesure d'activation de Ras dans les HUVEC stimulées par du VEGF. Malheureusement, ces

expériences n'ont pas été reproductibles et n'ont pas permis d'apporter des réponses définitives. J'ai contourné cette difficulté en utilisant des cellules MCF10A-RasG12V qui expriment une forme constitutivement active de Ras. Dans ce modèle cellulaire, COB223 n'inhibe pas la phosphorylation de MEK et de ERK. COB223 n'est pas efficace sur Ras activé. La cible de COB223 se situe donc en amont Ras activé.

✓ **Activation de ERK par le PMA**

J'ai démontré que dans les HUVEC, COB223 inhibait également la phosphorylation de ERK1/2, lorsque la PKC est directement activée par le PMA. Ce résultat situe le site d'action de COB223 en aval de PKC. De plus, COB223 n'est pas un inhibiteur de l'activité kinase de la PKC.

✓ **Voie ERK induite par le FGF-2 et le sérum**

Le sérum et le FGF-2 induisent également l'activation de la voie ERK. Il est établi que la signalisation de ERK induite par le FGF-2 implique le recrutement par le récepteur FGFR activé de GRB2 et SOS. Cette voie est commune à l'ensemble des récepteurs tyrosine-kinase à l'exception du VEGFR2. SOS active ensuite directement Ras. J'ai observé que dans les HUVEC, l'utilisation d'inhibiteurs de la PKC diminue partiellement la réponse de la voie ERK en réponse au FGF-2. Cette inhibition est au contraire totale lors d'une stimulation par le VEGF-A. Cela démontre qu'une partie du signal induit par le FGF-2 est également médiée par la PKC. COB223 inhibe la signalisation induite à la fois par le VEGF-A, FGF-2 et le sérum. Il est donc cohérent de penser, que COB223 agit sur une partie de la voie de signalisation commune à l'activation par le FGF-2 et le VEGF-A. L'ensemble de nos résultats sur la signalisation qui situe l'activité de COB223 en amont de Ras et Raf est compatible avec cette hypothèse.

✓ **Cibles potentielles**

Une cible potentielle de COB223 est SPK1 situé en aval de la PKC et en amont de Ras. Nous avons voulu évaluer si COB223 inhibait sa phosphorylation. A ce jour, nous ne disposons pas d'anticorps suffisamment sensibles et spécifiques pour répondre à cette question. Nous allons contourner cette difficulté en dosant en collaboration avec l'équipe du Dr. Olivier Cuvillier à Toulouse, le lipide S1P (Sphingosine-1 Phosphate) produit par les cellules en présence ou non de COB223. SPK1 convertit la sphingosine en S1P qui agit alors en messager secondaire qui pourrait à son tour activer des GAP [Shu et al., 2002].

Enfin, de nombreux facteurs sont impliqués dans l'activation de Ras. Ras est finement régulée par les GEF [Cherfils and Zeghouf, 2013] et les GAP [Overbeck et al., 1995] [Kashatus, 2013] qui établissent l'équilibre entre son activation et son inhibition. COB223 pourrait perturber un de ces facteurs (Figure 71), influençant ainsi la voie en aval.

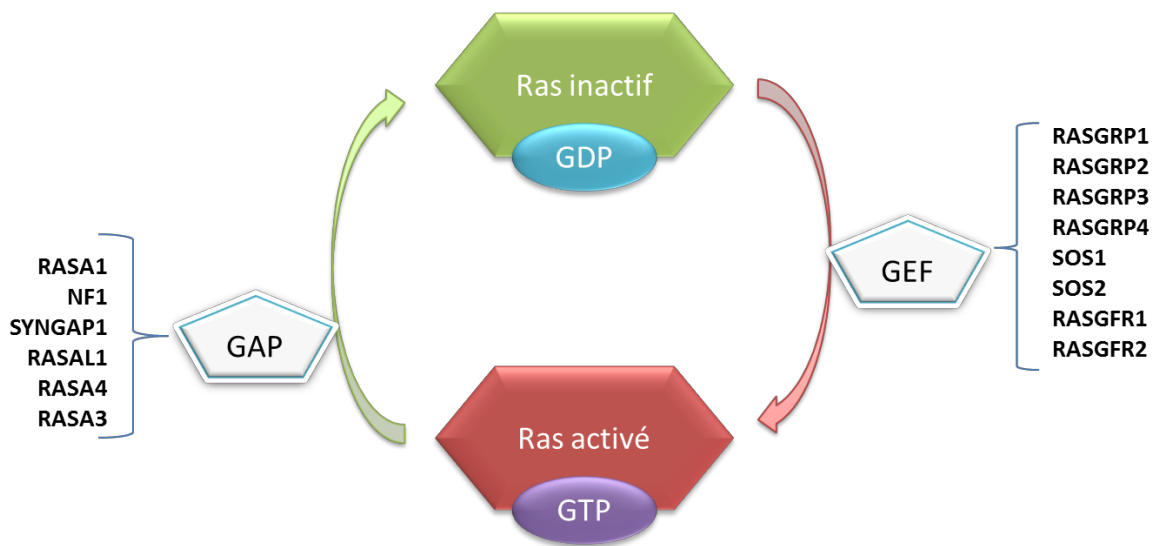


Figure 71 : Liste non exhaustive de GAP et de GEF impliqués dans la régulation de Ras.

7.6 Perspectives

Dans les traitements anti-angiogènes, l'un des problèmes majeurs est l'échappement des tumeurs au traitement. Cela s'explique notamment par la redondance des voies d'activation de l'angiogenèse. Il est connu, que l'inactivation de c-Raf induit à terme sa substitution par B-Raf voire de A-Raf [Valluet et al., 2012]. Dans ce contexte, COB223 pourrait représenter une alternative thérapeutique permettant de contourner les résistances primaires aux agents anti-angiogènes.

Une autre approche pour identifier la cible de COB223, est une approche protéomique. Nous allons coupler COB223 à une biotine afin de permettre sa fixation à une colonne avidine-sépharose. De cette manière, en utilisant des extraits protéiques traités par COB223, nous envisageons de pouvoir purifier la cible moléculaire et l'identifier par spectrométrie de masse MS/MS.

Il est également possible que COB223 n'ait pas une cible unique mais soit une molécule à cibles multiples. Nous avons focalisé dans un premier temps notre attention sur son activité anti-proliférative qui avait été observée aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. D'autres résultats n'ont par ailleurs, pas encore été totalement étudiés :

- ✓ Le différentiel d'activité sur les fibroblastes versus les cellules endothéliales et les cellules tumorales semblent dû à une différence de pénétration de la molécule dans les cellules. Cette différence reste encore à expliquer.
- ✓ COB223 semble ralentir le trafic du VEGFR-2. Néanmoins, nous n'avons pas pu démontrer que COB223 affecterait un des partenaires de l'endocytose ou du recyclage du VEGFR-2. Dans les HUVEC, en présence d'un inhibiteur de l'endocytose (pitstop et/ou dynasore), on observe un phénotype identique à celui que nous

observons avec COB223 : ralentissement de l'internalisation du VEGFR2, diminution de la phosphorylation de Raf, de MEK et de ERK induite par le VEGF alors que la phosphorylation du récepteur n'est pas modifiée [Gourlaouen et al., 2013]. L'analyse cinétique des événements semble cependant indiquer que les effets sur l'internalisation de VEGFR2 sont la conséquence des effets biologiques de COB223 plutôt que sa cible primaire.

- ✓ Des études de toxicité plus approfondies sont nécessaires afin de vérifier l'innocuité de COB223. Les souris que j'ai traitées dans nos expériences n'ont pas montré de signes d'intolérance à la molécule. Néanmoins, nos expériences n'ont duré que 20 jours, et il serait nécessaire d'augmenter cette durée pour évaluer la toxicité à long terme du produit sur les animaux. Par ailleurs, pour compléter nos études *in vivo*, il serait intéressant d'étudier l'effet anti-tumoral de COB223 dans d'autres modèles de xénogreffe et notamment sur des modèles orthotopiques (par exemple, injection de cellules MDA-MB231 de cancer du sein dans les coussinets de la glande mammaire de la souris Nude) et/ ou syngéniques afin d'évaluer l'effet anti-tumoral de COB223 dans un modèle immunocompétent (par exemple : cellules 4T1 dans les souris Balb/c ou cellules LLC/2 dans les souris C57Bl6).
- ✓ Afin de pouvoir proposer COB223 comme alternative thérapeutique, des études pharmacologiques complémentaires sont nécessaires : pharmacocinétique, biodisponibilité et biodistribution. Pour étudier la biodisponibilité et la biodistribution, les collègues chimistes vont générer une molécule marquée avec un radioélément. Nous avons choisi cette approche radioactive plutôt que le greffage d'une molécule fluorescente plus volumineuse qui pourrait induire un changement conformationnel et fonctionnel important. Le couplage d'un atome d'iode radioactif (I^{125}) devrait permettre de conserver l'activité anti-angiogène de COB223. Cela sera contrôlé dans un premier temps, avec un analogue froid. Puis, en collaboration avec une unité INSERM de Grenoble (U1039, Dr. Catherine Ghezzi), spécialisée dans la radio-imagerie du petit animal, nous injecterons COB223 ainsi modifié à des souris porteuses ou non de tumeurs. Cela devrait nous permettre de visualiser la distribution du composé dans les différents tissus de l'animal, les organes cibles et de rechercher une éventuelle accumulation dans les tumeurs.

Au cours de ce travail, j'ai pu développer un test d'angiogenèse adapté aux contraintes du robot de la plateforme HTS du CEA. Le criblage de la chimiothèque de l'Université de Grenoble nous a permis d'identifier une molécule pour laquelle nous sommes à mi-chemin du processus de validation comme nouveau composé anti-angiogène. J'ai déterminé que COB223 possède une activité anti-angiogène et anti-tumorale, et que son mécanisme d'action affecte la signalisation de la voie ERK. Cependant, il reste à déterminer sa cible

exacte. Identifier la cible de COB223 permettrait d'envisager des études de cristallographie qui pourraient permettre de développer des analogues plus affins avec la cible.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdulhussein AA, Wallace HM: Polyamines and membrane transporters. *Amino acids* 2014;46:655-660.
- Adams RH, Alitalo K: Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2007;8:464-478.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ: Hmec-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *The Journal of investigative dermatology* 1992;99:683-690.
- Aird WC: Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circulation research* 2007a;100:158-173.
- Aird WC: Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circulation research* 2007b;100:174-190.
- Alessandri G, Raju K, Gullino PM: Mobilization of capillary endothelium in vitro induced by effectors of angiogenesis in vivo. *Cancer Res* 1983;43:1790-1797.
- Allt G, Lawrenson JG: Pericytes: Cell biology and pathology. *Cells, tissues, organs* 2001;169:1-11.
- Almagro S, Durmort C, Chervin-Petinot A, Heyraud S, Dubois M, Lambert O, Maillefaud C, Hewat E, Schaal JP, Huber P, Gulino-Debrac D: The motor protein myosin-x transports ve-cadherin along filopodia to allow the formation of early endothelial cell-cell contacts. *Molecular and cellular biology* 2010;30:1703-1717.
- Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P: Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association* 1991;11:1223-1230.
- Armulik A, Genove G, Betsholtz C: Pericytes: Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell* 2011;21:193-215.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM: Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research* 1999;85:221-228.
- Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N: Angiogenesis assays: A critical overview. *Clinical chemistry* 2003;49:32-40.
- Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R, Kessler H: Arg-gly-asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment p1. *FEBS letters* 1991;291:50-54.
- Baldwin ME, Halford MM, Roufail S, Williams RA, Hibbs ML, Grail D, Kubo H, Stacker SA, Achen MG: Vascular endothelial growth factor d is dispensable for development of the lymphatic system. *Molecular and cellular biology* 2005;25:2441-2449.
- Ballmer-Hofer K, Andersson AE, Ratcliffe LE, Berger P: Neuropilin-1 promotes vegfr-2 trafficking through rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* 2011;118:816-826.
- Baluk P, Hashizume H, McDonald DM: Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Current opinion in genetics & development* 2005;15:102-111.

- Bastaki M, Nelli EE, Dell'Era P, Rusnati M, Molinari-Tosatti MP, Parolini S, Auerbach R, Ruco LP, Possati L, Presta M: Basic fibroblast growth factor-induced angiogenic phenotype in mouse endothelium. A study of aortic and microvascular endothelial cell lines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:454-464.
- Batchelor TT, Sorensen AG, di Tomaso E, Zhang WT, Duda DG, Cohen KS, Kozak KR, Cahill DP, Chen PJ, Zhu M, Ancukiewicz M, Mrugala MM, Plotkin S, Drappatz J, Louis DN, Ivy P, Scadden DT, Benner T, Loeffler JS, Wen PY, Jain RK: Azd2171, a pan-vegf receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. *Cancer cell* 2007;11:83-95.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ: Vegf165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 2002;62:4123-4131.
- Beck L, Jr., D'Amore PA: Vascular development: Cellular and molecular regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1997;11:365-373.
- Benedito R, Roca C, Sorensen I, Adams S, Gossler A, Fruttiger M, Adams RH: The notch ligands dll4 and jagged1 have opposing effects on angiogenesis. *Cell* 2009;137:1124-1135.
- Bergers G, Benjamin LE: Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003;3:401-410.
- Bergers G, Hanahan D: Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* 2008;8:592-603.
- Bikfalvi A, Cramer EM, Tenza D, Tobelem G: Phenotypic modulations of human umbilical vein endothelial cells and human dermal fibroblasts using two angiogenic assays. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 1991;72:275-278.
- Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NF, Wheatley DN: An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis* 1999;3:335-344.
- Boturyn D, Boudali A, Constant J-F, Defrancq E, Lhomme J: Synthesis of fluorescent probes for the detection of abasic sites in DNA. *Tetrahedron* 1997;53:5485-5492.
- Boyden S: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 1962;115:453-466.
- Brooks PC, Montgomery AM, Cheresh DA: Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis. *Methods in molecular biology* 1999;129:257-269.
- Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J: Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-1886.
- Bruns AF, Bao L, Walker JH, Ponnambalam S: Vegf-a-stimulated signalling in endothelial cells via a dual receptor tyrosine kinase system is dependent on co-ordinated trafficking and proteolysis. *Biochemical Society transactions* 2009;37:1193-1197.
- Byrd N, Grabel L: Hedgehog signaling in murine vasculogenesis and angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine* 2004;14:308-313.
- Caduff JH, Fischer LC, Burri PH: Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *The Anatomical record* 1986;216:154-164.
- Cao Y, Ji WR, Qi P, Rosin A, Cao Y: Placenta growth factor: Identification and characterization of a novel isoform generated by rna alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:493-498.

- Carew JS, Nawrocki ST, Reddy VK, Bush D, Rehg JE, Goodwin A, Houghton JA, Casero RA, Jr., Marton LJ, Cleveland JL: The novel polyamine analogue cgc-11093 enhances the antimyeloma activity of bortezomib. *Cancer Res* 2008;68:4783-4790.
- Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine* 2003;9:653-660.
- 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, Nagy A: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature* 1996;380:435-439.
- Carmeliet P, Jain RK: Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298-307.
- Carmeliet P, Tessier-Lavigne M: Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* 2005;436:193-200.
- Casero RA, Jr., Marton LJ: Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nature reviews Drug discovery* 2007;6:373-390.
- Caunt M, Mak J, Liang WC, Stawicki S, Pan Q, Tong RK, Kowalski J, Ho C, Reslan HB, Ross J, Berry L, Kasman I, Zlot C, Cheng Z, Le Couter J, Filvaroff EH, Plowman G, Peale F, French D, Carano R, Koch AW, Wu Y, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A: Blocking neuropilin-2 function inhibits tumor cell metastasis. *Cancer cell* 2008;13:331-342.
- Cebe Suarez S, Pieren M, Cariolato L, Arn S, Hoffmann U, Bogucki A, Manlius C, Wood J, Ballmer-Hofer K: A vegf-a splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through vegfr-2. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2006;63:2067-2077.
- Chaudhary A, King WG, Mattaliano MD, Frost JA, Diaz B, Morrison DK, Cobb MH, Marshall MS, Brugge JS: Phosphatidylinositol 3-kinase regulates raf1 through pak phosphorylation of serine 338. *Current biology : CB* 2000;10:551-554.
- Chen TT, Luque A, Lee S, Anderson SM, Segura T, Iruela-Arispe ML: Anchorage of vegf to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells. *The Journal of cell biology* 2010;188:595-609.
- Cherfils J, Zeghouf M: Regulation of small gtpases by gefs, gaps, and gdis. *Physiological reviews* 2013;93:269-309.
- Chong H, Vikis HG, Guan KL: Mechanisms of regulating the raf kinase family. *Cell Signal* 2003;15:463-469.
- Cleaver O, Melton DA: Endothelial signaling during development. *Nature medicine* 2003;9:661-668.
- Collen A, Hanemaaijer R, Lupu F, Quax PH, van Lent N, Grimbergen J, Peters E, Koolwijk P, van Hinsbergh VW: Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 2003;101:1810-1817.
- Connolly JO, Simpson N, Hewlett L, Hall A: Rac regulates endothelial morphogenesis and capillary assembly. *Molecular biology of the cell* 2002;13:2474-2485.
- Cooke JP, Losordo DW: Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 2002;105:2133-2135.
- Coultas L, Chawengsaksophak K, Rossant J: Endothelial cells and vegf in vascular development. *Nature* 2005;438:937-945.
- Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF: Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circulation research* 2000;87:728-730.
- David L, Feige JJ, Bailly S: Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 2009;20:203-212.

- Deady LW, Desneves J, Kaye AJ, Finlay GJ, Baguley BC, Denny WA: Synthesis and antitumor activity of some indeno[1,2-b]quinoline-based bis carboxamides. *Bioorg Med Chem* 2000;8:977-984.
- DeFeo D, Gonda MA, Young HA, Chang EH, Lowy DR, Scolnick EM, Ellis RW: Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of harvey murine sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:3328-3332.
- Dejana E: Endothelial adherens junctions: Implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *The Journal of clinical investigation* 1996;98:1949-1953.
- Dejana E, Corada M, Lampugnani MG: Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995;9:910-918.
- Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF: Cd34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 1993;81:1001-1008.
- Deng CX, Wynshaw-Boris A, Shen MM, Daugherty C, Ornitz DM, Leder P: Murine fgfr-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes & development* 1994;8:3045-3057.
- Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A: Tgf-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature genetics* 2001;29:117-129.
- Desroches-Castan A, Cherradi N, Feige JJ, Ciais D: A novel function of tis11b/brf1 as a regulator of dll4 mrna 3'-end processing. *Molecular biology of the cell* 2011;22:3625-3633.
- Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM: Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:656-664.
- Dorrell MI, Friedlander M: Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Progress in retinal and eye research* 2006;25:277-295.
- Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, Costa L, Henrique D, Rossant J: Dosage-sensitive requirement for mouse dll4 in artery development. *Genes & development* 2004;18:2474-2478.
- Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, Breitman ML: Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & development* 1994;8:1897-1909.
- Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, Alitalo K: Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in vegf receptor-3. *Science* 1998;282:946-949.
- Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS: Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer cell* 2009;15:232-239.
- Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA: Association of sos ras exchange protein with grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature* 1993;363:45-51.
- Eichmann A, Le Noble F, Autiero M, Carmeliet P: Guidance of vascular and neural network formation. *Current opinion in neurobiology* 2005;15:108-115.
- Eichmann A, Simons M: Vegf signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Current opinion in cell biology* 2012;24:188-193.

- Elias AP, Dias S: Microenvironment changes (in ph) affect vegf alternative splicing. *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2008;1:131-139.
- Ellis LM, Hicklin DJ: Pathways mediating resistance to vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2008;14:6371-6375.
- Esteban LM, Vicario-Abejon C, Fernandez-Salguero P, Fernandez-Medarde A, Swaminathan N, Yienger K, Lopez E, Malumbres M, McKay R, Ward JM, Pellicer A, Santos E: Targeted genomic disruption of h-ras and n-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Molecular and cellular biology* 2001;21:1444-1452.
- Evensen L, Link W, Lorens JB: Imaged-based high-throughput screening for anti-angiogenic drug discovery. *Current pharmaceutical design* 2010a;16:3958-3963.
- Evensen L, Micklem DR, Link W, Lorens JB: A novel imaging-based high-throughput screening approach to anti-angiogenic drug discovery. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2010b;77:41-51.
- Ewan LC, Jopling HM, Jia H, Mittar S, Bagherzadeh A, Howell GJ, Walker JH, Zachary IC, Ponnambalam S: Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic* 2006;7:1270-1282.
- Fang S, Salven P: Stem cells in tumor angiogenesis. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2011;50:290-295.
- Feraud O, Cao Y, Vittet D: Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest* 2001;81:1669-1681.
- Feraud O, Vittet D: Murine embryonic stem cell in vitro differentiation: Applications to the study of vascular development. *Histol Histopathol* 2003;18:191-199.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW: Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the vegf gene. *Nature* 1996;380:439-442.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, Novotny W: Discovery and development of bevacizumab, an anti-vegf antibody for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* 2004;3:391-400.
- Ferrara N, Kerbel RS: Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005;438:967-974.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P: Anti-plgf inhibits growth of vegf(r)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell* 2007;131:463-475.
- Folkman J: Tumor angiogenesis: Therapeutic implications. *The New England journal of medicine* 1971;285:1182-1186.
- Folkman J: Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine* 2003;3:643-651.
- Folkman J: Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nature reviews Drug discovery* 2007;6:273-286.
- Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G: Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J Exp Med* 1971;133:275-288.
- Fox S, Farr-Jones S, Yund MA: High throughput screening for drug discovery: Continually transitioning into new technology. *Journal of biomolecular screening* 1999;4:183-186.

- Francavilla C, Maddaluno L, Cavallaro U: The functional role of cell adhesion molecules in tumor angiogenesis. *Seminars in cancer biology* 2009;19:298-309.
- Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T: Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4733-4740.
- Fukumura D, Xu L, Chen Y, Gohongi T, Seed B, Jain RK: Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 2001;61:6020-6024.
- Gale NW, Kaplan S, Lowenstein EJ, Schlessinger J, Bar-Sagi D: Grb2 mediates the egf-dependent activation of guanine nucleotide exchange on ras. *Nature* 1993;363:88-92.
- Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC, Coll JL: New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2005;12:1168-1175.
- Gariano RF, Gardner TW: Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 2005;438:960-966.
- Gerhardt H, Betsholtz C: Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research* 2003;314:15-23.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C: Vegf guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 2003;161:1163-1177.
- Gerhardt H, Ruhrberg C, Abramsson A, Fujisawa H, Shima D, Betsholtz C: Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2004;231:503-509.
- Gerner EW, Meyskens FL, Jr.: Polyamines and cancer: Old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer* 2004;4:781-792.
- Geudens I, Gerhardt H: Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. *Development* 2011;138:4569-4583.
- Ghajar CM, Blevins KS, Hughes CC, George SC, Putnam AJ: Mesenchymal stem cells enhance angiogenesis in mechanically viable prevascularized tissues via early matrix metalloproteinase upregulation. *Tissue engineering* 2006;12:2875-2888.
- Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, Schwartz MA, Benson AB, 3rd, Eastern Cooperative Oncology Group Study E: Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (folfox4) for previously treated metastatic colorectal cancer: Results from the eastern cooperative oncology group study e3200. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2007;25:1539-1544.
- Gibbs JB, Sigal IS, Poe M, Scolnick EM: Intrinsic gtpase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:5704-5708.
- Gilman AG: G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annual review of biochemistry* 1987;56:615-649.
- Gliki G, Abu-Ghazaleh R, Jezequel S, Wheeler-Jones C, Zachary I: Vascular endothelial growth factor-induced prostacyclin production is mediated by a protein kinase c (pkc)-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 involving pkc-delta and by mobilization of intracellular ca²⁺. *The Biochemical journal* 2001;353:503-512.

- Goh LK, Sorkin A: Endocytosis of receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2013;5:a017459.
- Gough W, Hulkower KI, Lynch R, McGlynn P, Uhlik M, Yan L, Lee JA: A quantitative, facile, and high-throughput image-based cell migration method is a robust alternative to the scratch assay. *Journal of biomolecular screening* 2011;16:155-163.
- Gourlaouen M, Welte JC, Vasudev NS, Reynolds AR: Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of erk1/2 in endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 2013;288:7467-7480.
- Griffith CK, George SC: The effect of hypoxia on in vitro prevascularization of a thick soft tissue. *Tissue engineering Part A* 2009;15:2423-2434.
- Gu F, Li X, Kong J, Pan B, Sun M, Zheng L, Yao Y: Vegf111b, a new member of vegfxxb isoforms and induced by mitomycin c, inhibits angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;441:18-24.
- Guy J, Caron K, Dufresne S, Michnick SW, Skene WG, Keillor JW: Convergent preparation and photophysical characterization of dimaleimide dansyl fluorogens: Elucidation of the maleimide fluorescence quenching mechanism. *J Am Chem Soc* 2007;129:11969-11977.
- Haggarty SJ, Mayer TU, Miyamoto DT, Fathi R, King RW, Mitchison TJ, Schreiber SL: Dissecting cellular processes using small molecules: Identification of colchicine-like, taxol-like and other small molecules that perturb mitosis. *Chemistry & biology* 2000;7:275-286.
- Haiko P, Mäkinen T, Keskkitalo S, Taipale J, Kärkkäinen MJ, Baldwin ME, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K: Deletion of vascular endothelial growth factor c (vegfc) and vegfd is not equivalent to vegfr3 deletion in mouse embryos. *Molecular and cellular biology* 2008;28:4843-4850.
- Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ: A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the caax motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 1990;63:133-139.
- Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S: Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting vegfr1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nature medicine* 2002;8:841-849.
- Hellstrom M, Phng LK, Gerhardt H: Vegf and notch signaling: The yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell adhesion & migration* 2007a;1:133-136.
- Hellstrom M, Phng LK, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, Alva J, Nilsson AK, Karlsson L, Gaiano N, Yoon K, Rossant J, Iruela-Arispe ML, Kalen M, Gerhardt H, Betsholtz C: Dll4 signalling through notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* 2007b;445:776-780.
- Henderson AM, Wang SJ, Taylor AC, Aitkenhead M, Hughes CC: The basic helix-loop-helix transcription factor hesr1 regulates endothelial cell tube formation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:6169-6176.
- Herzog B, Pellet-Many C, Britton G, Hartzoulakis B, Zachary IC: Vegf binding to nrp1 is essential for vegf stimulation of endothelial cell migration, complex formation between nrp1 and vegfr2, and signaling via fak tyr407 phosphorylation. *Molecular biology of the cell* 2011;22:2766-2776.
- Hirschi KK, Rohovsky SA, D'Amore PA: Pdgf, tgf-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10t1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *The Journal of cell biology* 1998;141:805-814.

- Hlushchuk R, Riesterer O, Baum O, Wood J, Gruber G, Pruschy M, Djonov V: Tumor recovery by angiogenic switch from sprouting to intussusceptive angiogenesis after treatment with ptk787/zk222584 or ionizing radiation. *The American journal of pathology* 2008;173:1173-1185.
- Hofer E, Schweighofer B: Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thrombosis and haemostasis* 2007;97:355-363.
- Holmqvist K, Cross M, Riley D, Welsh M: The shb adaptor protein causes src-dependent cell spreading and activation of focal adhesion kinase in murine brain endothelial cells. *Cell Signal* 2003;15:171-179.
- Holmqvist K, Cross MJ, Rolny C, Hagerkvist R, Rahimi N, Matsumoto T, Claesson-Welsh L, Welsh M: The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (vegf) receptor-2 and regulates vegf-dependent cellular migration. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:22267-22275.
- Horowitz A, Seerapu HR: Regulation of vegf signaling by membrane traffic. *Cell Signal* 2012;24:1810-1820.
- Hughes S, Chan-Ling T: Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science* 2004;45:2795-2806.
- Hurley JB, Simon MI, Teplow DB, Robishaw JD, Gilman AG: Homologies between signal transducing g proteins and ras gene products. *Science* 1984;226:860-862.
- Ibrahimi OA, Zhang F, Hrstka SC, Mohammadi M, Linhardt RJ: Kinetic model for fgf, fgfr, and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* 2004;43:4724-4730.
- Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, Hu-Lowe DD, Shalinsky DR, Thurston G, Yancopoulos GD, McDonald DM: Inhibition of vascular endothelial growth factor (vegf) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *The American journal of pathology* 2004;165:35-52.
- Jackson CJ, Nguyen M: Human microvascular endothelial cells differ from macrovascular endothelial cells in their expression of matrix metalloproteinases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1997;29:1167-1177.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation* 1973;52:2745-2756.
- Jain RK: Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nature medicine* 2001;7:987-989.
- Jain RK: Normalization of tumor vasculature: An emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307:58-62.
- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, Rosewell I, Busse M, Thurston G, Medvinsky A, Schulte-Merker S, Gerhardt H: Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nature cell biology* 2010;12:943-953.
- Jakobsson L, Kreuger J, Holmborn K, Lundin L, Eriksson I, Kjellen L, Claesson-Welsh L: Heparan sulfate in trans potentiates vegfr-mediated angiogenesis. *Developmental cell* 2006;10:625-634.
- Johnson KR, Becker KP, Facchinetti MM, Hannun YA, Obeid LM: Pkc-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (pma). *The Journal of biological chemistry* 2002;277:35257-35262.

- Jones EA, Yuan L, Breant C, Watts RJ, Eichmann A: Separating genetic and hemodynamic defects in neuropilin 1 knockout embryos. *Development* 2008;135:2479-2488.
- Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC: Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Three routes to regeneration. *Nature reviews Molecular cell biology* 2011;12:79-89.
- Jopling HM, Odell AF, Hooper NM, Zachary IC, Walker JH, Ponnambalam S: Rab gtpase regulation of vegfr2 trafficking and signaling in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:1119-1124.
- Joulain F, Proskorovsky I, Allegra C, Tabernero J, Hoyle M, Iqbal SU, Van Cutsem E: Mean overall survival gain with aflibercept plus folfiri vs placebo plus folfiri in patients with previously treated metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer* 2013;109:1735-1743.
- Kamal A, Srinivas O, Ramulu P, Ramesh G, Kumar PP: Synthesis of novel c2 and c2-c8 linked pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepine-naphthalimide hybrids as DNA-binding agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:3577-3581.
- Kamata T, Feramisco JR: Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature* 1984;310:147-150.
- Kamlah F, Eul BG, Li S, Lang N, Marsh LM, Seeger W, Grimminger F, Rose F, Hanze J: Intravenous injection of sirna directed against hypoxia-inducible factors prolongs survival in a lewis lung carcinoma cancer model. *Cancer gene therapy* 2009;16:195-205.
- Kanzawa S, Endo H, Shioya N: Improved in vitro angiogenesis model by collagen density reduction and the use of type iii collagen. *Annals of plastic surgery* 1993;30:244-251.
- Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, Alitalo K: Vascular endothelial growth factor c is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nature immunology* 2004;5:74-80.
- Karnoub AE, Weinberg RA: Ras oncogenes: Split personalities. *Nature reviews Molecular cell biology* 2008;9:517-531.
- Kashatus DF: Ral gtpases in tumorigenesis: Emerging from the shadows. *Exp Cell Res* 2013;319:2337-2342.
- Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD: Thrombospondin-1 inhibits vegf receptor-2 signaling by disrupting its association with cd47. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:38923-38932.
- Kawamura H, Li X, Goishi K, van Meeteren LA, Jakobsson L, Cebe-Suarez S, Shimizu A, Edholm D, Ballmer-Hofer K, Kjellen L, Klagsbrun M, Claesson-Welsh L: Neuropilin-1 in regulation of vegf-induced activation of p38mapk and endothelial cell organization. *Blood* 2008;112:3638-3649.
- Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, Fujisawa H: A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development* 1999;126:4895-4902.
- Kearney JB, Kappas NC, Ellerstrom C, DiPaola FW, Bautch VL: The vegf receptor flt-1 (vegfr-1) is a positive modulator of vascular sprout formation and branching morphogenesis. *Blood* 2004;103:4527-4535.
- Keramidas M, Josserand V, Feige JJ, Coll JL: Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using rgd-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol Imaging Biol* 2013a;15:239-244.
- Keramidas M, Josserand V, Feige JJ, Coll JL: Noninvasive and quantitative assessment of in vivo angiogenesis using rgd-based fluorescence imaging of subcutaneous sponges. *Mol Imaging Biol* 2013b;15:239-244.

Kerbel RS: Tumor angiogenesis. *The New England journal of medicine* 2008;358:2039-2049.

Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, Ferrara N: Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding kdr and flt-1 receptors. Generation of receptor-selective vegf variants by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:5638-5646.

Koch S, Claesson-Welsh L: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012;2:a006502.

Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L: Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal* 2011;437:169-183.

Kodera Y, Katanasaka Y, Kitamura Y, Tsuda H, Nishio K, Tamura T, Koizumi F: Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R66.

Koera K, Nakamura K, Nakao K, Miyoshi J, Toyoshima K, Hatta T, Otani H, Aiba A, Katsuki M: K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 1997;15:1151-1159.

Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR: Protein kinase c alpha activates raf-1 by direct phosphorylation. *Nature* 1993;364:249-252.

Korff T, Augustin HG: Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *The Journal of cell biology* 1998;143:1341-1352.

Krebs LT, Starling C, Chervonsky AV, Gridley T: Notch1 activation in mice causes arteriovenous malformations phenocopied by ephrinb2 and ephb4 mutants. *Genesis* 2010;48:146-150.

Kroll J, Waltenberger J: The vascular endothelial growth factor receptor kdr activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:32521-32527.

Kucharzewska P, Welch JE, Svensson KJ, Belting M: The polyamines regulate endothelial cell survival during hypoxic stress through pi3k/akt and mcl-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;380:413-418.

Kulkarni AB, Huh CG, Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts AB, Sporn MB, Ward JM, Karlsson S: Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:770-774.

Lamallice L, Houle F, Huot J: Phosphorylation of tyr1214 within vegfr-2 triggers the recruitment of nck and activation of fyn leading to sapk2/p38 activation and endothelial cell migration in response to vegf. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:34009-34020.

Lampugnani MG: Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods in molecular biology* 1999;96:177-182.

Lampugnani MG, Orsenigo F, Gagliani MC, Tacchetti C, Dejana E: Vascular endothelial cadherin controls vegfr-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The Journal of cell biology* 2006;174:593-604.

Lanahan AA, Hermans K, Claes F, Kerley-Hamilton JS, Zhuang ZW, Giordano FJ, Carmeliet P, Simons M: Vegf receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Developmental cell* 2010;18:713-724.

Lawley TJ, Kubota Y: Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *The Journal of investigative dermatology* 1989;93:59S-61S.

- Lawson ND, Mugford JW, Diamond BA, Weinstein BM: Phospholipase c gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes & development* 2003;17:1346-1351.
- Lazo JS, Wipf P: Combinatorial chemistry and contemporary pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2000;293:705-709.
- Lee L, Sharma S, Morgan B, Allegrini P, Schnell C, Brueggen J, Cozens R, Horsfield M, Guenther C, Steward WP, Dreves J, Lebwohl D, Wood J, McSheehy PM: Biomarkers for assessment of pharmacologic activity for a vascular endothelial growth factor (vegf) receptor inhibitor, ptk787/zk 222584 (ptk/zk): Translation of biological activity in a mouse melanoma metastasis model to phase i studies in patients with advanced colorectal cancer with liver metastases. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2006;57:761-771.
- Leevers SJ, Marshall CJ: Activation of extracellular signal-regulated kinase, erk2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J* 1992;11:569-574.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
- Li JL, Sainson RC, Shi W, Leek R, Harrington LS, Preusser M, Biswas S, Turley H, Heikamp E, Hainfellner JA, Harris AL: Delta-like 4 notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2007;67:11244-11253.
- Li N, Batzer A, Daly R, Yajnik V, Skolnik E, Chardin P, Bar-Sagi D, Margolis B, Schlessinger J: Guanine-nucleotide-releasing factor hSos1 binds to Grb2 and links receptor tyrosine kinases to Ras signalling. *Nature* 1993;363:85-88.
- Li W, Chong H, Guan KL: Function of the rho family GTPases in Ras-stimulated Raf activation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:34728-34737.
- Li X, Tjwa M, Van Hove I, Enholm B, Neven E, Paavonen K, Jeltsch M, Juan TD, Sievers RE, Chorianopoulos E, Wada H, Vanwildemeersch M, Noel A, Foidart JM, Springer ML, von Degenfeld G, Dewerchin M, Blau HM, Alitalo K, Eriksson U, Carmeliet P, Moons L: Reevaluation of the role of vegf-b suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:1614-1620.
- Liao HJ, Kume T, McKay C, Xu MJ, Ihle JN, Carpenter G: Absence of erythropoiesis and vasculogenesis in plg1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:9335-9341.
- Limaverde-Sousa G, Sternberg C, Ferreira CG: Antiangiogenesis beyond vegf inhibition: A journey from antiangiogenic single-target to broad-spectrum agents. *Cancer treatment reviews* 2013.
- Limbourg A, Ploom M, Elligsen D, Sorensen I, Ziegelhoeffer T, Gossler A, Drexler H, Limbourg FP: Notch ligand delta-like 1 is essential for postnatal arteriogenesis. *Circulation research* 2007;100:363-371.
- Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Karlsson L, Pekny M, Pekna M, Soriano P, Betsholtz C: Paracrine pdgf-b/pdgf-rbeta signaling controls mesangial cell development in kidney glomeruli. *Development* 1998;125:3313-3322.
- Loges S, Mazzone M, Hohensinner P, Carmeliet P: Silencing or fueling metastasis with vegf inhibitors: Antiangiogenesis revisited. *Cancer cell* 2009;15:167-170.
- Loges S, Schmidt T, Carmeliet P: Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. *Genes & cancer* 2010;1:12-25.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compennolle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R,

- Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P: Revascularization of ischemic tissues by plgf treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-flt1. *Nature medicine* 2002;8:831-840.
- Ma L, Francia G, Vilorio-Petit A, Hicklin DJ, du Manoir J, Rak J, Kerbel RS: In vitro procoagulant activity induced in endothelial cells by chemotherapy and antiangiogenic drug combinations: Modulation by lower-dose chemotherapy. *Cancer Res* 2005;65:5365-5373.
- Magnusson PU, Ronca R, Dell'Era P, Carlstedt P, Jakobsson L, Partanen J, Dimberg A, Claesson-Welsh L: Fibroblast growth factor receptor-1 expression is required for hematopoietic but not endothelial cell development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:944-949.
- Mancuso MR, Davis R, Norberg SM, O'Brien S, Sennino B, Nakahara T, Yao VJ, Inai T, Brooks P, Freemark B, Shalinsky DR, Hu-Lowe DD, McDonald DM: Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of vegf inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2006;116:2610-2621.
- Manickam V, Tiwari A, Jung JJ, Bhattacharya R, Goel A, Mukhopadhyay D, Choudhury A: Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 trafficking and angiogenesis by golgi localized t-snare syntaxin 6. *Blood* 2011;117:1425-1435.
- Marais R, Light Y, Paterson HF, Mason CS, Marshall CJ: Differential regulation of raf-1, a-raf, and b-raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:4378-4383.
- Matallanas D, Birtwistle M, Romano D, Zebisch A, Rauch J, von Kriegsheim A, Kolch W: Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks. *Genes & cancer* 2011;2:232-260.
- Matsumoto T, Bohman S, Dixelius J, Berge T, Dimberg A, Magnusson P, Wang L, Wikner C, Qi JH, Wernstedt C, Wu J, Bruheim S, Mugishima H, Mukhopadhyay D, Spurkland A, Claesson-Welsh L: Vegf receptor-2 y951 signaling and a role for the adapter molecule tsad in tumor angiogenesis. *EMBO J* 2005;24:2342-2353.
- Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, Tessmer J, Warltier DC, Chilian WM: Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation* 2002;105:2185-2191.
- McCull BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG: Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors vegf-c and vegf-d. *J Exp Med* 2003;198:863-868.
- Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K: Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires ras activation. *The Journal of biological chemistry* 2001;276:49289-49298.
- Mebratu Y, Tesfagzi Y: How erk1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* 2009;8:1168-1175.
- Mercer K, Chioeches A, Huser M, Kiernan M, Marais R, Pritchard C: Erk signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking a-raf. *Oncogene* 2002;21:347-355.
- Merdzhanova G, Gout S, Keramidas M, Edmond V, Coll JL, Brambilla C, Brambilla E, Gazzeri S, Eymin B: The transcription factor e2f1 and the sr protein sc35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-a to inhibit neovascularization in vivo. *Oncogene* 2010;29:5392-5403.
- Miaczynska M, Christoforidis S, Giner A, Shevchenko A, Uttenweiler-Joseph S, Habermann B, Wilm M, Parton RG, Zerial M: Appl proteins link rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell* 2004;116:445-456.

- Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, Klagsbrun M: Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2000;14:2532-2539.
- Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Ruth J, Wieser R, Zatloukal K, Beug H, Wagner EF, Baccharini M: Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene. *EMBO J* 2001;20:1952-1962.
- Miller DL: Angiography in polyarteritis nodosa. *AJR American journal of roentgenology* 2000;175:1747-1748.
- Mita MM, Sargsyan L, Mita AC, Spear M: Vascular-disrupting agents in oncology. *Expert Opin Investig Drugs* 2013;22:317-328.
- Montagna E, Canello G, Bagnardi V, Pastrello D, Dellapasqua S, Perri G, Viale G, Veronesi P, Luini A, Intra M, Calleri A, Rampinelli C, Goldhirsch A, Bertolini F, Colleoni M: Metronomic chemotherapy combined with bevacizumab and erlotinib in patients with metastatic her2-negative breast cancer: Clinical and biological activity. *Clinical breast cancer* 2012;12:207-214.
- Moodie SA, Willumsen BM, Weber MJ, Wolfman A: Complexes of ras.Gtp with raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 1993;260:1658-1661.
- Morice C, Nothias F, Konig S, Vernier P, Baccharini M, Vincent JD, Barnier JV: Raf-1 and b-raf proteins have similar regional distributions but differential subcellular localization in adult rat brain. *The European journal of neuroscience* 1999;11:1995-2006.
- Morrison DK, Cutler RE: The complexity of raf-1 regulation. *Current opinion in cell biology* 1997;9:174-179.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X, Figlin RA: Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:3584-3590.
- Motzer RJ, Michaelson MD, Rosenberg J, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Wilding G: Sunitinib efficacy against advanced renal cell carcinoma. *The Journal of urology* 2007;178:1883-1887.
- Mould AW, Greco SA, Cahill MM, Tonks ID, Bellomo D, Patterson C, Zournazi A, Nash A, Scotney P, Hayward NK, Kay GF: Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-b isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circulation research* 2005;97:e60-70.
- Mukherjee S, Tessema M, Wandinger-Ness A: Vesicular trafficking of tyrosine kinase receptors and associated proteins in the regulation of signaling and vascular function. *Circulation research* 2006;98:743-756.
- Murakami M, Iwai S, Hiratsuka S, Yamauchi M, Nakamura K, Iwakura Y, Shibuya M: Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 2006;108:1849-1856.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM: Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *The Journal of clinical investigation* 1998;101:2567-2578.
- Naccache SN, Hasson T, Horowitz A: Binding of internalized receptors to the pdz domain of gipc/synectin recruits myosin vi to endocytic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12735-12740.

- Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF: Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 2008;11:109-119.
- Nakayama M, Nakayama A, van Lessen M, Yamamoto H, Hoffmann S, Drexler HC, Itoh N, Hirose T, Breier G, Vestweber D, Cooper JA, Ohno S, Kaibuchi K, Adams RH: Spatial regulation of vegf receptor endocytosis in angiogenesis. *Nature cell biology* 2013;15:249-260.
- Nassar N, Horn G, Herrmann C, Scherer A, McCormick F, Wittinghofer A: The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-raf1 in complex with rap1a and a gtp analogue. *Nature* 1995;375:554-560.
- Nicoli S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty KE, Lawson ND: MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and vegf signalling during angiogenesis. *Nature* 2010;464:1196-1200.
- Nicosia RF, Ottinetti A: Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990;63:115-122.
- Nihei Y, Suga Y, Morinaga Y, Ohishi K, Okano A, Ohsumi K, Hatanaka T, Nakagawa R, Tsuji T, Akiyama Y, Saito S, Hori K, Sato Y, Tsuruo T: A novel combretastatin a-4 derivative, ac-7700, shows marked antitumor activity against advanced solid tumors and orthotopically transplanted tumors. *Japanese journal of cancer research : Gann* 1999;90:1016-1025.
- Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetsee S, Boland P, Gale NW, Lin HC, Yancopoulos GD, Thurston G: Blockade of dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Nature* 2006;444:1032-1037.
- Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L: Vegf receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:359-371.
- Overbeck AF, Brtva TR, Cox AD, Graham SM, Huff SY, Khosravi-Far R, Quilliam LA, Soliski PA, Der CJ: Guanine nucleotide exchange factors: Activators of ras superfamily proteins. *Molecular reproduction and development* 1995;42:468-476.
- Ozerdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB: Ng2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 2001;222:218-227.
- Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O: Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer cell* 2009;15:220-231.
- Panchagnula R, Thomas NS: Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Int J Pharm* 2000;201:131-150.
- Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA: Human ej bladder carcinoma oncogene is homologue of harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 1982;297:474-478.
- Parsons JT: Focal adhesion kinase: The first ten years. *Journal of cell science* 2003;116:1409-1416.
- Paz-Ares LG, Biesma B, Heigener D, von Pawel J, Eisen T, Bennouna J, Zhang L, Liao M, Sun Y, Gans S, Syrigos K, Le Marie E, Gottfried M, Vansteenkiste J, Alberola V, Strauss UP, Montegriffo E, Ong TJ, Santoro A, Group NREUSIS: Phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of gemcitabine/cisplatin alone or with sorafenib for the first-line treatment of advanced, nonsquamous non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:3084-3092.

- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS: Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and erbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: Angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *The American journal of pathology* 1997;151:1523-1530.
- Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D: Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by att-20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-3806.
- Potenza N, Vecchione C, Notte A, De Rienzo A, Rosica A, Bauer L, Affuso A, De Felice M, Russo T, Poulet R, Cifelli G, De Vita G, Lembo G, Di Lauro R: Replacement of k-ras with h-ras supports normal embryonic development despite inducing cardiovascular pathology in adult mice. *EMBO reports* 2005;6:432-437.
- Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M: Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:159-178.
- Pritchard CA, Samuels ML, Bosch E, McMahon M: Conditionally oncogenic forms of the a-raf and b-raf protein kinases display different biological and biochemical properties in nih 3t3 cells. *Molecular and cellular biology* 1995;15:6430-6442.
- Qu X, Zhuang G, Yu L, Meng G, Ferrara N: Induction of bv8 expression by granulocyte colony-stimulating factor in cd11b+gr1+ cells: Key role of stat3 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2012;287:19574-19584.
- Ramlau R, Gorbunova V, Ciuleanu TE, Novello S, Ozguroglu M, Goksel T, Baldotto C, Bennouna J, Shepherd FA, Le-Guenec S, Rey A, Miller V, Thatcher N, Scagliotti G: Aflibercept and docetaxel versus docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: A randomized, controlled phase iii trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:3640-3647.
- Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, Bonner TI, Groffen J, Reynolds FH, Jr., Stephenson JR: Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:4218-4222.
- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M: A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the t24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature* 1982;300:149-152.
- Reichelt M, Shi S, Hayes M, Kay G, Batch J, Gole GA, Browning J: Vascular endothelial growth factor-b and retinal vascular development in the mouse. *Clinical & experimental ophthalmology* 2003;31:61-65.
- Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang WC, Chanthery Y, Kowalski J, Watts RJ, Callahan C, Kasman I, Singh M, Chien M, Tan C, Hongo JA, de Sauvage F, Plowman G, Yan M: Inhibition of dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* 2006;444:1083-1087.
- Rini BI: Quantifying hypertension in patients with cancer treated with sorafenib. *The lancet oncology* 2008;9:86-87.
- Risau W: Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997;386:671-674.
- Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annual review of cell and developmental biology* 1995;11:73-91.
- Roberts AB, Sporn MB: Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by tgfbeta. *The American review of respiratory disease* 1989;140:1126-1128.
- Rossant J, Howard L: Signaling pathways in vascular development. *Annual review of cell and developmental biology* 2002;18:541-573.

- Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P: Role and therapeutic potential of vegf in the nervous system. *Physiological reviews* 2009;89:607-648.
- Rymo SF, Gerhardt H, Wolfhagen Sand F, Lang R, Uv A, Betsholtz C: A two-way communication between microglial cells and angiogenic sprouts regulates angiogenesis in aortic ring cultures. *PLoS One* 2011;6:e15846.
- Sakurai Y, Ohgimoto K, Kataoka Y, Yoshida N, Shibuya M: Essential role of flk-1 (vegf receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1076-1081.
- Sala-Rabanal M, Li DC, Dake GR, Kurata HT, Inyushin M, Skatchkov SN, Nichols CG: Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters oct1, oct2, and oct3. *Molecular pharmaceutics* 2013;10:1450-1458.
- Salikhova A, Wang L, Lanahan AA, Liu M, Simons M, Leenders WP, Mukhopadhyay D, Horowitz A: Vascular endothelial growth factor and semaphorin induce neuropilin-1 endocytosis via separate pathways. *Circulation research* 2008;103:e71-79.
- Sancey L, Dufort S, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Rome C, Faure AC, Foillard S, Roux S, Boturyn D, Tillement O, Koenig A, Boutet J, Rizo P, Dumy P, Coll JL: Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm* 2009;379:309-316.
- Savai R, Langheinrich AC, Schermuly RT, Pullamsetti SS, Dumitrascu R, Traupe H, Rau WS, Seeger W, Grimminger F, Banat GA: Evaluation of angiogenesis using micro-computed tomography in a xenograft mouse model of lung cancer. *Neoplasia* 2009;11:48-56.
- Sawamiphak S, Seidel S, Essmann CL, Wilkinson GA, Pitulescu ME, Acker T, Acker-Palmer A: Ephrin-b2 regulates vegfr2 function in developmental and tumour angiogenesis. *Nature* 2010;465:487-491.
- Schaber MD, O'Hara MB, Garsky VM, Mosser SC, Bergstrom JD, Moores SL, Marshall MS, Friedman PA, Dixon RA, Gibbs JB: Polyisoprenylation of ras in vitro by a farnesyl-protein transferase. *The Journal of biological chemistry* 1990;265:14701-14704.
- Schafer WR, Trueblood CE, Yang CC, Mayer MP, Rosenberg S, Poulter CD, Kim SH, Rine J: Enzymatic coupling of cholesterol intermediates to a mating pheromone precursor and to the ras protein. *Science* 1990;249:1133-1139.
- Scheffzek K, Ahmadian MR, Kabsch W, Wiesmuller L, Lautwein A, Schmitz F, Wittinghofer A: The ras-rasgap complex: Structural basis for gtpase activation and its loss in oncogenic ras mutants. *Science* 1997;277:333-338.
- Shih TY, Papageorge AG, Stokes PE, Weeks MO, Scolnick EM: Guanine nucleotide-binding and autophosphorylating activities associated with the p21src protein of harvey murine sarcoma virus. *Nature* 1980;287:686-691.
- Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N: Role of bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2640-2645.
- Shu X, Wu W, Mosteller RD, Broek D: Sphingosine kinase mediates vascular endothelial growth factor-induced activation of ras and mitogen-activated protein kinases. *Molecular and cellular biology* 2002;22:7758-7768.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, et al.: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992;359:693-699.
- Shutter JR, Scully S, Fan W, Richards WG, Kitajewski J, Deblandre GA, Kintner CR, Stark KL: Dll4, a novel notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes & development* 2000;14:1313-1318.

- Siekman AF, Covassin L, Lawson ND: Modulation of vegf signalling output by the notch pathway. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2008;30:303-313.
- Silvestre JS, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, Duriez M, Schwartz B, Branellec D, Levy BI: Vascular endothelial growth factor-b promotes in vivo angiogenesis. *Circulation research* 2003;93:114-123.
- Sims DE: The pericyte--a review. *Tissue & cell* 1986;18:153-174.
- Singh AJ, Meyer RD, Band H, Rahimi N: The carboxyl terminus of vegfr-2 is required for pkc-mediated down-regulation. *Molecular biology of the cell* 2005;16:2106-2118.
- Sonveaux P, Jordan BF, Gallez B, Feron O: Nitric oxide delivery to cancer: Why and how? *European journal of cancer* 2009;45:1352-1369.
- Stanton VP, Jr., Cooper GM: Activation of human raf transforming genes by deletion of normal amino-terminal coding sequences. *Molecular and cellular biology* 1987;7:1171-1179.
- Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, Barrios CH, Salman P, Gladkov OA, Kavina A, Zarba JJ, Chen M, McCann L, Pandite L, Roychowdhury DF, Hawkins RE: Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase iii trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2010;28:1061-1068.
- Stratman AN, Davis MJ, Davis GE: Vegf and fgf prime vascular tube morphogenesis and sprouting directed by hematopoietic stem cell cytokines. *Blood* 2011;117:3709-3719.
- Stromblad S, Cheresh DA: Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chemistry & biology* 1996;3:881-885.
- Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Breant C, Duarte A, Eichmann A: The notch ligand delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:3225-3230.
- Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD: Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996;87:1171-1180.
- Svensson KJ, Welch JE, Kucharzewska P, Bengtson P, Bjurberg M, Pahlman S, Ten Dam GB, Persson L, Belting M: Hypoxia-mediated induction of the polyamine system provides opportunities for tumor growth inhibition by combined targeting of vascular endothelial growth factor and ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 2008;68:9291-9301.
- Sweet RW, Yokoyama S, Kamata T, Feramisco JR, Rosenberg M, Gross M: The product of ras is a gtpase and the t24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* 1984;311:273-275.
- Swinney DC, Anthony J: How were new medicines discovered? *Nature reviews Drug discovery* 2011;10:507-519.
- Tabernero J, Van Cutsem E, Lakomy R, Prausova J, Ruff P, van Hazel GA, Moiseyenko VM, Ferry DR, McKendrick JJ, Soussan-Lazard K, Chevalier S, Allegra CJ: Aflibercept versus placebo in combination with fluorouracil, leucovorin and irinotecan in the treatment of previously treated metastatic colorectal cancer: Prespecified subgroup analyses from the velour trial. *European journal of cancer* 2014;50:320-331.
- Takahashi T, Ueno H, Shibuya M: Vegf activates protein kinase c-dependent, but ras-independent raf-mek-map kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 1999;18:2221-2230.

- Takahashi T, Yamaguchi S, Chida K, Shibuya M: A single autophosphorylation site on kdr/flk-1 is essential for vegf-a-dependent activation of plc-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J* 2001;20:2768-2778.
- Tammela T, Zarkada G, Nurmi H, Jakobsson L, Heinolainen K, Tvorogov D, Zheng W, Franco CA, Murtomaki A, Aranda E, Miura N, Yla-Herttuala S, Fruttiger M, Makinen T, Eichmann A, Pollard JW, Gerhardt H, Alitalo K: Vegfr-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing notch signalling. *Nature cell biology* 2011;13:1202-1213.
- Taparowsky E, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M: Structure and activation of the human n-ras gene. *Cell* 1983;34:581-586.
- Taparowsky E, Suard Y, Fasano O, Shimizu K, Goldfarb M, Wigler M: Activation of the t24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. *Nature* 1982;300:762-765.
- Tayade C, Hilchie D, He H, Fang Y, Moons L, Carmeliet P, Foster RA, Croy BA: Genetic deletion of placenta growth factor in mice alters uterine nk cells. *Journal of immunology* 2007;178:4267-4275.
- Taylor KL, Henderson AM, Hughes CC: Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic hlh transcription factor hesr-1 and downregulates vegfr-2/kdr expression. *Microvascular research* 2002;64:372-383.
- Thomas T, Thomas TJ: Polyamines in cell growth and cell death: Molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2001;58:244-258.
- Thorpe PE: Vascular targeting agents as cancer therapeutics. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10:415-427.
- Tozer GM, Prise VE, Wilson J, Locke RJ, Vojnovic B, Stratford MR, Dennis MF, Chaplin DJ: Combretastatin a-4 phosphate as a tumor vascular-targeting agent: Early effects in tumors and normal tissues. *Cancer Res* 1999;59:1626-1634.
- Troidl C, Troidl K, Schierling W, Cai WJ, Nef H, Mollmann H, Kostin S, Schimanski S, Hammer L, Elsasser A, Schmitz-Rixen T, Schaper W: Trpv4 induces collateral vessel growth during regeneration of the arterial circulation. *Journal of cellular and molecular medicine* 2009;13:2613-2621.
- Umanoff H, Edelmann W, Pellicer A, Kucherlapati R: The murine n-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:1709-1713.
- Vailhe B, Vittet D, Feige JJ: In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest* 2001;81:439-452.
- Valluet A, Druillennec S, Barbotin C, Dorard C, Monsoro-Burq AH, Larcher M, Pouponnot C, Baccarini M, Larue L, Eychene A: B-raf and c-raf are required for melanocyte stem cell self-maintenance. *Cell reports* 2012;2:774-780.
- Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, Prenen H, Prausova J, Macarulla T, Ruff P, van Hazel GA, Moiseyenko V, Ferry D, McKendrick J, Polikoff J, Tellier A, Castan R, Allegra C: Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase iii randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:3499-3506.
- Varsano T, Dong MQ, Niesman I, Gacula H, Lou X, Ma T, Testa JR, Yates JR, 3rd, Farquhar MG: Gipc is recruited by appl to peripheral trka endosomes and regulates trka trafficking and signaling. *Molecular and cellular biology* 2006;26:8942-8952.
- Vaupel P, Hockel M: Blood supply, oxygenation status and metabolic micromilieu of breast cancers: Characterization and therapeutic relevance. *Int J Oncol* 2000;17:869-879.

- Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P: Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:6273-6278.
- Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E: Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996;88:3424-3431.
- Wang L, Mukhopadhyay D, Xu X: C terminus of rgs-gaip-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006;20:1513-1515.
- Wang X, Schneider H-J: Binding of dansylamide [dagger] derivatives to nucleotides and nucleic acids 1. *J Chem Soc Perkin Trans 2* 1998:1323-1328.
- Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Luthi U, Barberis A, Benjamin LE, Makinen T, Nobes CD, Adams RH: Ephrin-b2 controls vegf-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* 2010;465:483-486.
- Wang Z, Cohen K, Shao Y, Mole P, Dombkowski D, Scadden DT: Ephrin receptor, ephb4, regulates es cell differentiation of primitive mammalian hemangioblasts, blood, cardiomyocytes, and blood vessels. *Blood* 2004;103:100-109.
- Warne PH, Viciano PR, Downward J: Direct interaction of ras and the amino-terminal region of raf-1 in vitro. *Nature* 1993;364:352-355.
- Warner AJ, Lopez-Dee J, Knight EL, Feramisco JR, Prigent SA: The shc-related adaptor protein, sck, forms a complex with the vascular-endothelial-growth-factor receptor kdr in transfected cells. *The Biochemical journal* 2000;347:501-509.
- Warren CM, Ziyad S, Briot A, Der A, Iruela-Arispe ML: A ligand-independent vegfr2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. *Science signaling* 2014;7:ra1.
- Watson O, Novodvorsky P, Gray C, Rothman AM, Lawrie A, Crossman DC, Haase A, McMahon K, Gering M, Van Eeden FJ, Chico TJ: Blood flow suppresses vascular notch signalling via dll4 and is required for angiogenesis in response to hypoxic signalling. *Cardiovasc Res* 2013;100:252-261.
- Wellner M, Maasch C, Kupprion C, Lindschau C, Luft FC, Haller H: The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein kinase c-alpha and protein kinase c-zeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:178-185.
- West M, Kung HF, Kamata T: A novel membrane factor stimulates guanine nucleotide exchange reaction of ras proteins. *FEBS letters* 1990;259:245-248.
- Westenskow PD, Kurihara T, Aguilar E, Scheppke EL, Moreno SK, Wittgrove C, Marchetti V, Michael IP, Anand S, Nagy A, Cheresch D, Friedlander M: Ras pathway inhibition prevents neovascularization by repressing endothelial cell sprouting. *The Journal of clinical investigation* 2013;123:4900-4908.
- White RE: High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2000;40:133-157.
- Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S: Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nature reviews Drug discovery* 2006;5:835-844.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M: Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both raf and vegf and pdgf receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 2008;7:3129-3140.

- Williams CK, Li JL, Murga M, Harris AL, Tosato G: Up-regulation of the notch ligand delta-like 4 inhibits vegf-induced endothelial cell function. *Blood* 2006;107:931-939.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniessel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W: Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *Journal of cell science* 1994;107 (Pt 5):1347-1357.
- Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S: Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thrombosis and haemostasis* 2003;89:573-582.
- Wong ET, Gautam S, Malchow C, Lun M, Pan E, Brem S: Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: A meta-analysis. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 2011;9:403-407.
- Wu JM, Staton CA: Anti-angiogenic drug discovery: Lessons from the past and thoughts for the future. *Expert opinion on drug discovery* 2012;7:723-743.
- Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, Newsome WP, Jirousek MR, King GL: Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase c, its isoforms, and endothelial cell growth. *The Journal of clinical investigation* 1996;98:2018-2026.
- Xue L, Greisler HP: Angiogenic effect of fibroblast growth factor-1 and vascular endothelial growth factor and their synergism in a novel in vitro quantitative fibrin-based 3-dimensional angiogenesis system. *Surgery* 2002;132:259-267.
- Yamaguchi TP, Harpal K, Henkemeyer M, Rossant J: Fgfr-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes & development* 1994;8:3032-3044.
- Yan J, Roy S, Apolloni A, Lane A, Hancock JF: Ras isoforms vary in their ability to activate raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:24052-24056.
- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA: A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *The New England journal of medicine* 2003a;349:427-434.
- Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H: Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *Journal of cardiovascular pharmacology* 1996;27:838-844.
- Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, Torry DS: Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (plgf-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *Journal of reproductive immunology* 2003b;60:53-60.
- Yang Y, Xie P, Opatowsky Y, Schlessinger J: Direct contacts between extracellular membrane-proximal domains are required for vegf receptor activation and cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1906-1911.
- Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ, Kerbel RS: Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002;295:1526-1528.
- Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, Eichmann A: Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development* 2002;129:4797-4806.
- Zanetti A, Lampugnani MG, Balconi G, Breviario F, Corada M, Lanfrancone L, Dejana E: Vascular endothelial growth factor induces shc association with vascular endothelial cadherin: A potential feedback mechanism to control vascular endothelial growth factor receptor-2 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:617-622.

- Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR: A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of biomolecular screening* 1999;4:67-73.
- Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM, Takeuchi-Suzuki E, Elledge SJ, Marshall MS, Bruder JT, Rapp UR, Avruch J: Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-raf-1. *Nature* 1993;364:308-313.
- Zhang Z, Neiva KG, Lingen MW, Ellis LM, Nor JE: Vegf-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of vegfr1 and vegfr2. *Cell death and differentiation* 2010;17:499-512.
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M: Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation research* 2002;90:284-288.
- Zhou S, Yang Y, Yang Y, Tao H, Li D, Zhang J, Jiang G, Fang J: Combination therapy of vegf-trap and gemcitabine results in improved anti-tumor efficacy in a mouse lung cancer model. *PLoS One* 2013;8:e68589.

ANNEXES

Brevet « composés anti-angiogéniques, compositions pharmaceutiques les comprenant, et leur utilisation. » Feige JJ, Castan A, Quelard D, Demeunynck M, Constant JF, Barette C., 31 janvier 2011 , n°11/00277, déposé par le CNRS, extension PCT au 31 janvier 2012.

COMPOSES ANTI-ANGIOGENIQUES, COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES COMPRENANT, ET LEUR UTILISATION

La présente invention concerne des composés ayant une activité anti-angiogénique et/ou antitumorale, les compositions pharmaceutiques les comprenant et leur utilisation dans le traitement du cancer.

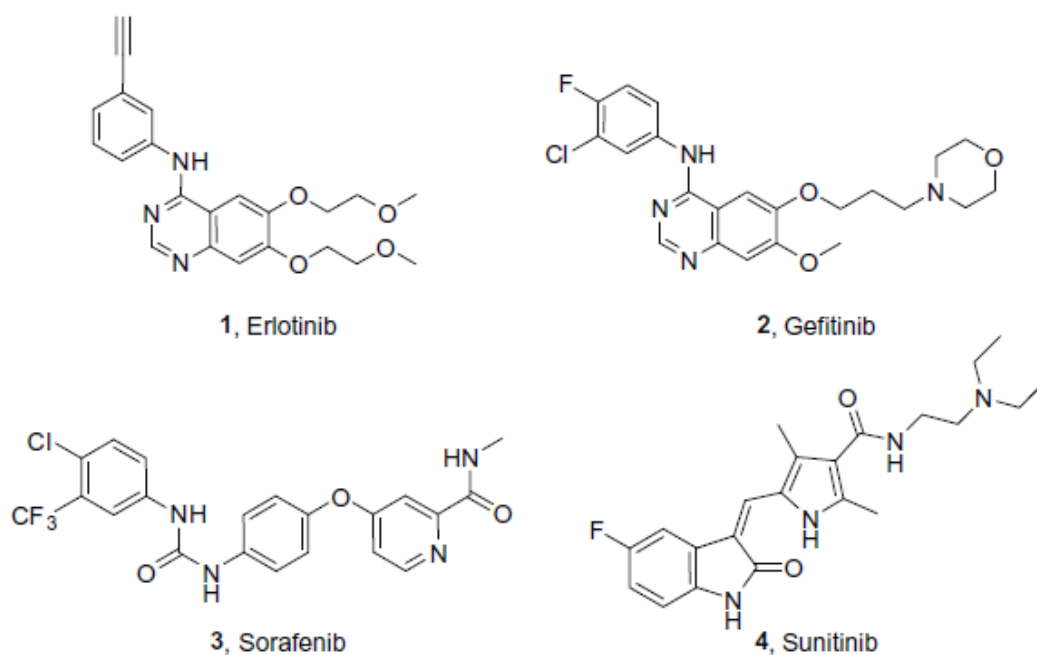
L'angiogenèse est un processus de croissance de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Trois phénomènes particuliers sont notamment à la base de ce processus : la prolifération, la migration et la différenciation (la tubulogenèse) des cellules endothéliales. L'angiogenèse est activée par certains facteurs de croissances, dits facteurs angiogéniques, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, facteur de croissance endothélial vasculaire), le FGF-1 (Fibroblast Growth Factor 1, facteur de croissance des fibroblastes 1) ou le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2, facteur de croissance des fibroblastes 2).

Au stade adulte, l'angiogenèse est essentiellement restreinte aux organes endocrines (ovaire, uterus, placenta) et au processus de cicatrisation des plaies. Cependant, l'angiogenèse est également impliquée dans de nombreux cas pathologiques, tels que la rétinopathie diabétique, le psoriasis, l'arthrite rhumatoïde, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, et les cancers. En effet, dans ce dernier cas il a été montré que la croissance tumorale était grandement favorisée par l'apparition au sein de ces tumeurs d'une néo-vascularisation sanguine résultant en particulier de la sécrétion par les tumeurs de facteurs angiogéniques.

De nombreuses molécules à activité anti-angiogéniques ont été développées ces dernières années. Parmi elles, le Bevacizumab (Avastatin®), un anticorps monoclonal anti-VEGF humanisé, a été le premier médicament anti-angiogénique approuvé et est actuellement utilisé dans le traitement thérapeutique des cancers du colon métastatique, du poumon, du sein métastatique et bientôt du rein. Ce médicament, combiné à un traitement par chimiothérapie, permet d'améliorer la survie des patients porteurs de tumeurs cancéreuses agressives. Toutefois, un certain nombre de problèmes sont apparus tels que des effets secondaires indésirables (cicatrisation ralentie, hypertension artérielle, saignements) ou une absence de réponse au traitement d'une fraction imprédictible des patients traités.

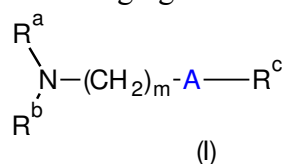
D'autres molécules, bloquant le même processus d'angiogenèse tumorale, mais visant d'autres cibles moléculaires ont été développées.

Ainsi, de petites molécules capables d'inhiber le site de liaison de l'ATP des tyrosines kinase, telles que l'erlotinib **1**, le gefitinib **2**, ont récemment été approuvées dans le traitement du cancer du poumon. Toutefois, ces molécules posent des problèmes de résistance. Par ailleurs, des molécules capables d'inhiber plusieurs récepteurs de tyrosine kinase, le sorafenib **3** et le sunitinib **4**, ont également été approuvées comme médicament pour le traitement du cancer du rein. Toutefois, ces inhibiteurs multiples sont davantage susceptibles d'induire des effets secondaires. En outre, le sorafenib et le sunitinib ont été rapportés comme étant cardiotoxiques.



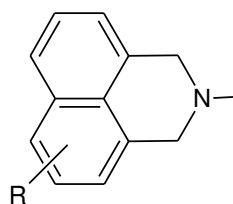
La présente invention a pour objet de fournir de nouveaux composés possédant une activité anti-angiogénique et/ou antitumorale pour le traitement et/ou la prévention de maladies liées à l'angiogénèse.

Ainsi, selon un premier aspect, l'invention concerne des composés de formule (I) pour leur utilisation pour inhiber l'angiogénèse :



dans laquelle :

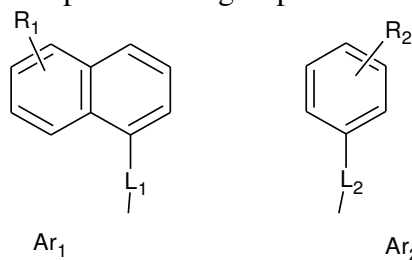
NR^aR^b représente un groupement choisi parmi $NHAr$, ou un groupe



R représente un groupement choisi parmi H, Cl, Br, I, F, NO_2 , $NR_{10}R_{11}$, N_3 ,

OR_{12} ;

Ar représente un groupement choisi parmi Ar_1 ou Ar_2



L_1 , L_2 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi $-SO_2-$, $-CH_2-OC(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $C(=O)-$, $NH(C=S)-$

R_1, R_2 , identiques ou différents, sont choisis parmi H, Cl, Br, alkyle en C_1-C_6 , NO_2 , NR_3R_4 , OR_{13} ;

R_3, R_4 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi H ou alkyle en C_1-C_6 ;

A représente un groupement choisi parmi une liaison ou un groupe Het – $(CH_2)_n-$, le groupe Het désignant un groupement hétérocyclyle de 5 à 7 chaînons ;

R^c représente un groupement choisi parmi OR_5 , ou NR_6R_7 ;

R_5 représente un groupement choisi parmi H, $-(CH_2)_p-OH$, alkyle en C_1-C_6 , $C(=O)R_{14}$;

R_6, R_7 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , $C(=O)OR_8$, $NHSO_2R_9$;

R_8 représente un groupement choisi parmi H ou C_1-C_6 alkyle ;

R_9 représente un groupement choisi parmi aryle en C_6-C_{10} éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes R_1 ;

R_{10}, R_{11} , identiques ou différents, représentent un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , ou aryle en C_6-C_{10} , ou bien R_{10} et R_{11} forment ensemble, avec l'atome d'azote auxquels ils sont attachés, une amine cyclique ;

R_{12}, R_{13}, R_{14} identiques ou différents, représentent chacun indépendamment un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , aryle en C_6-C_{10} ;

m est un entier de 1 à 6 ;

n est un entier de 1 à 6 ;

p est un entier de 1 à 4 ;

ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

La présente invention concerne également des composés de formule (I) pour leur utilisation dans le traitement et/ou la prévention des maladies liées à l'angiogenèse, telles que les cancers, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique, le psoriasis ou l'arthrite rhumatoïde.

On désigne par « angiogenèse » le phénomène de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène permet notamment la croissance tumorale. L'angiogenèse se trouve sous la dépendance de facteurs angiogéniques tels que les facteurs VEGF et FGF-2 par exemple.

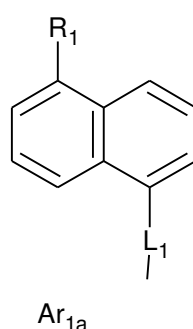
L'activité anti-angiogénique de composés chimiques peut être mise en évidence in vitro en démontrant par exemple l'inhibition à la fois de la prolifération, de la migration et de la tubulogenèse, de cellules endothéliales par les composés de l'invention. La mesure de l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales peut être réalisée en cultivant des cellules endothéliales en présence des composés dont on souhaite évaluer l'activité.

La mesure de l'inhibition de la migration des cellules endothéliales peut être réalisée en effectuant une « blessure » sur une monocouche de cellules endothéliales et en

incubant ensuite les cellules en présence des composés à tester. On mesure alors le taux de fermeture de la blessure. La mesure de l'inhibition de la tubulogénèse des cellules endothéliales peut être réalisée en mesurant la longueur des bourgeons formés par des cellules endothéliales cultivées sur gel en présence du composé à tester.

On désigne par activité anti-tumorale, une activité permettant d'inhiber la croissance tumorale et/ou d'induire la régression voir la disparition de tumeurs. Cette activité peut être par exemple mise en évidence *in vivo* en mesurant la masse de tumeurs, dont on a induit le développement chez la souris par injection de cellules tumorales, en présence et en absence d'administration des composés de l'invention.

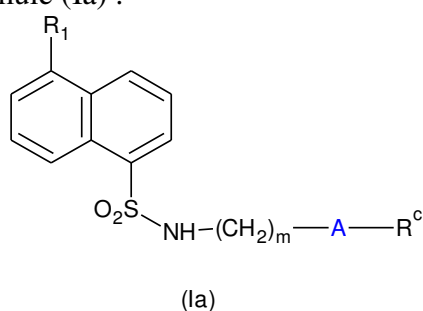
Parmi les composés de formule (I), un sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels Ar est un groupe Ar₁, notamment un groupe Ar_{1a} :



Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels L₁ est un groupe -SO₂-.

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels R₁ est NR₃R₄, de préférence N(CH₃)₂.

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés de formule (Ia) :



Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels m=3.

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels A est un groupe Het-(CH₂)_n-, notamment un groupe où

Het désigne une amine cyclique, en particulier un groupe .

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels n=3.

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels R^c est NR₆R₇.

Parmi les composés de formule (I), un autre sous-groupe de l'invention est constitué des composés pour lesquels NR₆R₇ est NHC(=O)OR₈, notamment NHC(=O)OC(CH₃)₃.

Parmi les composés de formule (I), les composés suivants peuvent être cités (nomenclature IUPAC générée par le logiciel AutoNom) : tert-butyl 3-(4-(3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 223)

- tert-butyl 3-(4-(3-(naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 235)
- tert-butyl 3-(4-(3-phénylamidopropyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 237)
- tert-butyl 3-(4-(3-(4-méthylphénylsulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 236)
- 4-nitrobenzyl N-[3-(4-{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}pipérazin-1-yl)propyl] carbamate (cob 238)
- 5-(diméthylamino)-N-[3-(diméthylamino)propyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 221)
- 5-(diméthylamino)-N-[3-hydroxypropyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 220)
- 2-(2-{4-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl]pipérazin-1-yl}éthoxy)éthan-1-ol (cob 224)
- 2-{2-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido]éthoxy}éthan-1-ol (cob 225)
- N-{3-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide (cob 227)
- Chlorhydrate de N-(3-aminopropyl)-1,8-naphtalimide (cob 226) Chlorhydrate de N-{3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide (cob 228)
- 1,3-bis(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-propane (05-06-L-F11)
- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diaminopropane (05-102-L-B09) 3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-propylamine (05-06-L-D03)
- Dansylcadavérine 6-(5-chloro-naphthalène-1-sulfonamido)hexylamine (W7)

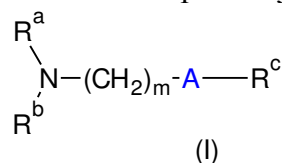
- 1,4-bis[(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl]pipérazine (Cob 222)
- Parmi ceux-ci, les composés suivants sont particulièrement préférés :
- tert-butyl 3-(4-(3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 223)
- N-{3-[4-(3-tert-butoxycarbonylamino)propyl]pipérazin-1-yl}propyl-1,8-naphthalimide (cob 227)
- 1,3-bis [5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido]diaminopropane (05-06-L-F11)
- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamino-propane (05-102-L-B09)

Selon un mode de réalisation, les composés de formule (I) sont administrés en mono- ou en co-thérapie, avec un ou plusieurs autres principes actifs connus pour traiter la maladie liée à l'angiogenèse souhaitée. Ainsi, les thérapies anti-cancer telles que la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie ou la chimiothérapie peuvent être combinées avec les composés selon l'invention. A titre d'exemple, les composés selon l'invention peuvent être co-administrés avec un ou plusieurs autres agents anticancéreux connus, comme le taxol, le paclitaxel et autres.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet les compositions pharmaceutiques comprenant un composé de formule (I) tel que défini ci-dessus, en association avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet une méthode pour inhiber l'angiogenèse, notamment une méthode de prévention et/ou de traitement des maladies liées à l'angiogenèse, comprenant l'administration d'une quantité thérapeutiquement efficace d'un composé de formule (I) à un patient qui en a besoin.

Selon un autre aspect, l'invention a pour objet les composés de formule (I) :



Dans laquelle

R^a , R^b , R^c , A et m étant tels que définis ci-dessus,

A l'exclusion des composés :

- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamino-propane (05-102-L-B09)
- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-1,3-propylamine (05-06-L-D03)
- 6-(5-chloro-naphthalène-1-sulfonamido)hexylamine (W7)
- 1,4-bis[(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl]pipérazine (Cob 222)

- Dansylcadavérine

Les composés de formule (I) peuvent exister à l'état de bases ou de sels d'addition, notamment à des acides. De tels sels d'addition font partie de l'invention.

Ces sels sont avantageusement préparés avec des acides pharmaceutiquement acceptables, mais les sels d'autres acides utiles, par exemple, pour la purification ou l'isolement des composés de formule (I) font également partie de l'invention.

Les composés de formule générale (I) peuvent être préparés par application ou adaptation de toute méthode connue en soi de et/ou à la portée de l'homme du métier, notamment celles décrites par Larock dans *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Pub., 1989, ou par application ou adaptation des procédés décrits dans les exemples qui suivent.

Définitions

Selon la présente invention, les radicaux « alkyle » représentent des radicaux hydrocarbonés saturés, en chaîne droite ou ramifiée, de 1 à 6 atomes de carbone, de préférence de 1 à 4 atomes de carbone. On peut notamment citer, lorsqu'ils sont linéaires, les radicaux méthyle, éthyle, propyle, butyle, pentyle, hexyle. On peut notamment citer, lorsqu'ils sont ramifiés ou substitués par un ou plusieurs radicaux alkyles, les radicaux isopropyle, tert-butyl, 2-méthylbutyle, 2-méthylpentyle, et le 1-méthylpentyle.

Selon la présente description, « hétérocycloalkyle » désigne un système cyclique saturé comprenant au moins un hétéroatome choisi parmi O, N ou S. Comme exemple de groupe hétérocycloalkyle, on peut notamment citer les groupes pyrrolidinyles, pyrrolinyles, imidazolidinyles, imidazolinyles, pirazolidinyles, pirazolinyles, pyrazalinyles, pipéridyles, ou pipérazinyles,

« Aryle » désigne un système aromatique hydrocarboné, mono ou bicyclique de 6 à 10 atomes de carbone. Parmi les radicaux aryles, on peut notamment citer le radical phényle ou naphthyle.

Selon la présente description, « hétéroaryle » désigne un système hydrocarboné aromatique, mono ou bicyclique comprenant de 5 à 10 chaînons, notamment de 5 à 7 chaînons.

Selon la présente description, les groupes « hétérocycles » représentent des groupes carbocycliques, saturés, insaturés ou aromatiques, dans lesquels le système cyclique comprend au moins un hétéroatome choisi parmi O, N ou S. Les atomes d'azote et de soufre peuvent être éventuellement oxydés. L'atome d'azote peut être éventuellement substitué par un groupe alkyle en C₁-C₆, ou aryle en C₆-C₁₀, lorsque le cycle n'est pas aromatique. Les groupes hétérocycles comprennent les groupes hétéroaryles et hétérocycloalkyles.

Selon la présente description, les « amines cycliques » représentent des groupes hétérocycles tels que définis ci-dessus, comprenant un atome d'azote.

L'expression « sels pharmaceutiquement acceptables » fait référence aux sels d'addition acide relativement non toxiques, inorganiques et organiques, et les sels d'addition de base, des composés de la présente invention. Ces sels peuvent être préparés *in*

situ pendant l'isolement final et la purification des composés. En particulier, les sels d'addition acide peuvent être préparés en faisant réagir séparément le composé purifié sous sa forme épurée avec un acide organique ou inorganique et en isolant le sel ainsi formé.

Parmi les exemples de sels d'addition acide, on trouve les sels d'addition d'acide inorganique tels que bromhydrate, chlorhydrate, sulfate, bisulfate, phosphate, nitrate, ainsi que les sels d'addition d'acide organique tels que acétate, oxalate, valérate, oléate, palmitate, stéarate, laurate, borate, benzoate, lactate, phosphate, tosylate, citrate, maléate, fumarate, succinate, tartrate, naphthylate, mésylate, glucoheptanate, lactobionate, sulfamates, malonates, salicylates, propionates et analogues. (Voir par exemple S.M. Berge et al. « Pharmaceutical Salts » J. Pharm. Sci, 66 :p.1-19 (1977)).

Les sels d'addition basique comprennent des sels dérivés de bases inorganiques telles que les hydroxydes d'ammonium et de métal alcalin ou alcalino-terreux, les carbonates, ou bicarbonates ainsi que les sels dérivés de bases organiques telles que les amines aliphatiques et aromatiques, les diamines aliphatiques et les hydroxyalkylamines. Comme exemple de bases utiles pour préparer des sels d'addition basique, on peut citer notamment l'hydroxyde d'ammonium, le carbonate de potassium, le bicarbonate de sodium, l'hydroxyde de calcium, la méthylamine, la diéthylamine, l'éthylène diamine ou l'éthanolamine.

Les exemples qui suivent sont décrits à titre illustratif et non limitatif.

FIGURES

Figure 1 : Inhibition *in vitro* de la formation de bourgeons endothéliaux dans des cellules HMEC-1 sous forme de sphéroïdes par les composés COB 223 et 05-06-L-F11 en présence de sérum.

Figure 2 : Inhibition *in vitro* de la formation de bourgeons endothéliaux dans des cellules HMEC-1 sous forme de sphéroïdes par les composés COB 223 et 05-06-L-F11 en présence de FGF-2.

Figure 3 : Inhibition *in vitro* de la formation de bourgeons endothéliaux dans des cellules souches embryonnaires par les composés COB 223 et 05-06-L-F1.

Figure 4 : Inhibition *in vivo* de la croissance de tumeurs TS/A par le composé COB 223.

EXEMPLES

Matériels et Méthodes

Culture cellulaire et réactifs

Les cellules HMEC-1 ont été fournies par le Centre de Contrôle et de Prévention des maladies (Center for Disease Control and Prevention) (Atlanta, GA, USA). Les cellules HMEC-1 et NIH-3T3 ont été maintenues dans le DMEM contenant 1g/l de glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) auquel ont été ajoutés 10% de sérum fœtal de veau (FCS) (Biowest, Abcys, Paris, France). Des cellules endothéliales microvasculaires de derme humain (HMVEC-d, LONZA, Bâle, Suisse) ont été maintenues dans un milieu de

croissance endothéliale (EGM-2-MV, Cambrex) auquel ont été ajoutés 5% de de FCS, ainsi que des additifs recommandés par le fabricant. Les cellules souches embryonnaires CJ7 (Swiatek PJ, 1993, Gene Dev) ont été cultivées sur des boîtes recouvertes de gélatine dans un milieu de Dulbecco modifié par Iscove (Invitrogen, Carlsbad, CA,) auquel ont été ajoutés 15 % de FCS, 1% d'acides aminés non essentiels, 1% d'ATAM, 150 μ M de monothioglycérol et 1000 U/mL de Facteur d'Inhibition de la Leucémie (ESGRO®, Chemicon, Temecula, CA). Les cellules TS/A-luc ont été généreusement offertes par Dr Jean-Luc Coll (INSERM U823) (Sancey L, Dufort S, Josserand V, Keramidas M, Righini C, Rome C, Faure AC, Foillard S, Roux S, Boturyn D, Tillement O, Koenig A, Boutet J, Rizo P, Dumy P, Coll JL. Drug development in oncology assisted by noninvasive optical imaging. *Int J Pharm.* 379: 309-16. (2009))

Préparation de lignées cellulaires fluorescentes

Les cellules HMEC-1 ou NIH-3T3 ont été infectées par un rétrovirus défectif codant pour la protéine eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*). Une construction contenant eGFP, sous contrôle du promoteur du cytomégalo virus humain herpétique (hCMV) a été sous-cloné dans le vecteur pLNCX. Cette construction a été introduite dans les cellules PT67 par transfection avec Effectène (Qiagen, Hilden, Allemagne). Le surnageant des cellules PT67 a été filtré pour récupérer les particules virales, afin d'infecter les cellules HMEC-1 et 3T3. Les clones exprimant eGFP ont été choisis par sélection à la néomycine. Les clones résistants ont été isolés par dilution limite et amplifiés dans des lignées cellulaires indépendantes. Ces lignées cellulaires exprimant de façon stable la protéine eGFP ont été nommées HMEC-1-GFP et 3T3-GFP.

Test de la "blessure"

Des monocouches de cellules confluentes ont été blessées avec la pointe d'une pipette plastique, lavées délicatement avec un tampon phosphate (PBS) et traitées avec des milieux finaux contenant des composés de formule (I). Les cellules ont été placées à 37°C dans l'incubateur et photographiées aux temps indiqués. La quantification de la fermeture de la blessure dans la monocouche a été réalisée en utilisant le programme Image J (NIH). Les résultats sont exprimés en pourcentage de blessure fermée à T24 comparée à la blessure initiale à T0.

Différenciation des cellules souches embryonnaires (ESC) dans le lignage endothélial

Les cellules CJ7 (1000 cellules/puits ; plaques de culture non traitées 12-puits) ont été soumises à une différenciation dans des gels de collagène dans un milieu Iscove contenant du Glutamax (Milieu Dulbecco modifié par Iscove) auquel ont été ajoutés 1,2 mg/mL de collagène I (BD Biosciences, Bedford, MA), 15% de sérum fœtal de veau (Invitrogen), 450 μ M monothioglycérol (Sigma-Aldrich), 10 μ g/mL d'insuline (Roche

Diagnostics, Bâle, Suisse), 50 U/mL de pénicilline et 50 µg/mL streptomycine (Invitrogen), tel que précédemment décrit. Un mélange de facteurs de croissance a également été ajouté contenant 50 ng/mL de VEGF-A humain (AbCys), 100 ng/mL de bFGF humain (Dr. A. Baird, Whittier Institute, La Jolla, CA) (Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. Blood 88:3424-31 (1996).). Au jour 6, les composés de formule (I) (solutions dans le DMSO) ont été ajoutés aux concentrations indiquées avec un nouvel ajout de 50 ng/mL de VEGF-A humain et 100 ng/mL de FGF-2 humain. La différenciation a été réalisée pendant 11 jours.

Immunocytochimie de corps embryonnaires

Les gels de collagène contenant des corps embryonnaires (EB) ont été deshydratés en utilisant des lingettes Kimwipes® Lite (Kimberly Clark, Nanterre, France) et une membrane en nylon, puis fixés par du paraformaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Les corps embryonnaires ont été incubés 1 h avec un anticorps monoclonal de rat dirigé contre la molécule d'adhésion des cellules endothéliales ou plaquettes de souris (PECAM)/CD31 (clone MEC-13.3, un don de Dr A. Vecchi, Milan, Italie) tel que précédemment décrit (Vittet et al. PNAS, 1997), puis incubés avec un anticorps d'âne anti-rat marqué avec une cyanine-3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA). Les corps embryonnaires ont ensuite été examinés avec un microscope fluorescent. Pour quantifier les bourgeons endothéliaux, les images ont été prises avec un appareil photographique et la longueur totale des bourgeons endothéliaux a été réalisée par analyse morphométrique en utilisant le logiciel Metamorph (Molecular Devices, Downington, PA).

Invasion de sphéroïdes HMEC-GFP dans la matrice collagène

Les cellules HMEC-GFP ont été développées sous forme de sphéroïdes dans un milieu Dulbecco modifié par Iscove contenant 0,2% de méthylcellulose dans des plaques 96 puits à fond rond. Deux jours après, les sphéroïdes ont été recueillis et l'invasion a été permise dans un milieu Dulbecco modifié par Iscove (IMDM), auquel ont été ajoutés 1,2 mg de collagène de type I, 50 U/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine. Les composés de formule (I) (en solution dans le DMSO) ou bFGF (en présence de la même quantité de DMSO) ont été ajoutés dans la préparation avant la gélification du collagène.

Analyse du cycle cellulaire

Les cellules HMVECd ont été privées de sérum pendant 48h, et ont ensuite été traitées avec des composés de formule (I) dans le milieu final (FCS 10%). Après 24 h, les cellules ont été trypsinisées et rassemblées avec les milieux conditionnés. Les noyaux ont ensuite été colorés avec l'iodure de propidium en utilisant le kit « Cycle Test Plus DNA » selon les instructions du fabricant (Becton Dickinson). Les extraits cellulaires ont été analysés en utilisant le cytomètre de flux FACScalibur (Becton Dickinson).

Modèle de tumeur-TSA de souris

Ce modèle a été choisi du fait de sa croissance rapide et de sa dépendance à l'angiogenèse dans des souris *nude* standards. Ce modèle a été utilisé pour étudier les effets *in vivo* du composé COB 223. Les cellules TSA/Luc (2×10^6 cellules dans 100 μ L de Matrigel 50% dans le DMEM) ont été injectées en sous-cutanée dans le flanc droit de souris nu/nu. Sept jours après inoculation de la tumeur, les souris ont subi une injection intrapéritonéale (i.p.) soit du véhicule à base de solvant (4 % DMSO) ou de 0,5 mg de COB 223 et des injections similaires ont été réalisées toutes les 48 heures. La taille de la tumeur a été mesurée avec un pied à coulisse et le volume a été calculé en appliquant la formule $[L \times l^2 \times 0,5]$, dans laquelle L et l représentent la longueur et la largeur respectivement. Toutes les souris ont été tuées 18 jours après inoculation de la tumeur. Au jour 15, les tumeurs ont été visualisées sous forme d'image dans un appareil d'imagerie par bioluminescence IVIS Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Les souris ont été visualisées 15 minutes après injection ip de la luciférine.

Synthèse chimique des composés de formule (I)

Protocole général

Des quantités stoechiométriques (0,65 mmol) de chlorure d'acyle et d'alkylamine (RNH_2) sont mélangées dans le dichlorométhane (3 mL) et la solution obtenue est agitée 15h à température ambiante. Une solution aqueuse (1M) de carbonate de sodium (3 mL) est ajoutée et le mélange obtenu est agité vigoureusement pendant 1 heure. On laisse ensuite décanter le mélange jusqu'à séparation nette de deux phases.

La phase organique est séparée, lavée plusieurs fois avec de l'eau, puis avec une solution de Brine. Elle est ensuite séchée sur du sulfate de magnésium, filtrée puis concentrée sous pression réduite. La plupart des composés de formule (I) obtenus sont isolés sous forme d'huiles.

La pureté des composés a ensuite été vérifiée par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance), et les structures chimiques confirmées par analyse RMN.

Les chlorures d'acyle mis en œuvre selon ce protocole général sont des chlorures d'acide carboxyliques (chlorure de benzoyle), les chlorures d'acide sulfonique (les chlorures de tosyle, d'acide naphthalène sulfonique, et de dansyle et des chloroformates (chlorure de para-nitrobenzyloxycarbonyle).

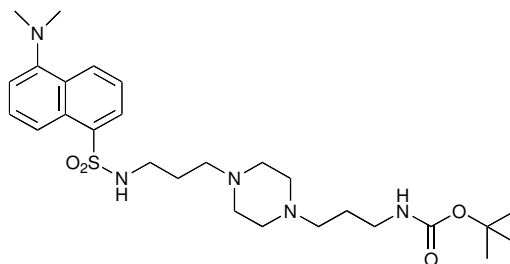
Les alkylamines mises en œuvre comme produit de départ peuvent contenir différents groupes fonctionnels (alcool, éther, amine, carbamate).

Les composés W7, monodansylcadaverine, 1,2-éthylènediamine, 1,3-diaminopropane, 1,4-diaminobutane ont été fournis par Sigma-Aldrich (St Louis).

Résultats

Exemple 1 : *tert-butyl 3-(4-(3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 223)*

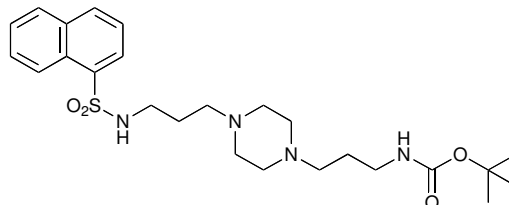
Le composé Cob 223 a été préparé selon le protocole général ci-dessus, à partir du chlorure de dansyle et du 3-[4-(3-*tert*-butoxycarbonylaminopropyl)-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783



RMN ^1H (CDCl_3) δ 8,51 (d, 1H), 8,31 (d, 1H), 8,23 (m, 1H), 7,47-7,53 (m, 2H), 7,16 (d, 1H), 5,35 (large s, NH), 3,16-3,22 (m, 2H), 2,94 (t, 2H), 2,3-2,5 (large m, 8H), 1,57-1,66 (m, 4H), 1,43 (s, 9H).

Exemple 2 : *tert-butyl 3-(4-(3-(naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 235)*

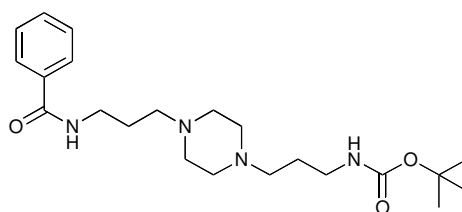
Le composé Cob 235 a été préparé selon le protocole général ci-dessus à partir de chlorure d'acide naphthalène sulfonique et de 3-[4-(3-*tert*-butoxycarbonylaminopropyl)-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783



RMN ^1H (CDCl_3) δ 8,59-8,62 (m, 1H), 8,15-8,17 (m, 1H), 7,95-7,97 (m, 1H), 7,85-7,87 (m, 1H), 7,43-7,54 (m, 3H), 5,37 (broad s, 1H), 5,21 (large s), 3,11-3,13, (m, 2H), 2,87 (t, 2H), 2,21-2,39 (large m, 8H), 1,50-1,62 (m, 4H), 1,48 (s, 9H)

Exemple 3 : *tert-butyl 3-(4-(3-phénylamidopropyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 237)*

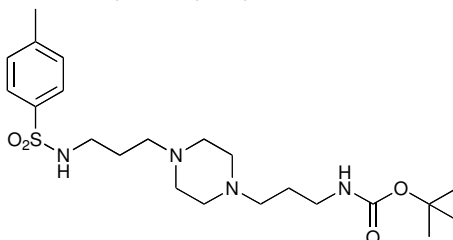
Le composé Cob 237 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de benzoyle et de 3-[4-(3-*tert*-butoxycarbonylaminopropyl)-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783.



RMN ^1H (CDCl_3) δ 8,21 (large s, 1H), 7,77-7,81 (m, 2H), 7,35-7,47 (m, 3H), 5,36 (large s, 1H), 3,51 (quad, 2H), 3,13 (quad, 2H), 2,34-2,55 (m, 8H), 1,75 (quint, 2H), 1,61 (quint, 2H), 1,41 (s, 9H)

Exemple 4 : *tert-butyl* 3-(4-(3-(4-méthylphénylsulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 236)

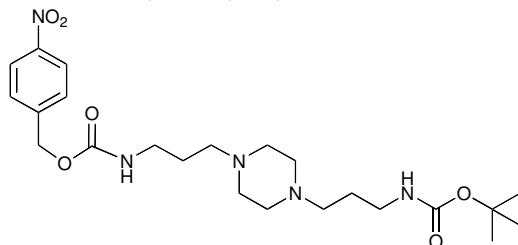
Le composé Cob 236 a été préparé selon le protocole général ci-dessus à partir de chlorure d'acide para-toluène sulfonique et de 3-[4-(3-tert-butoxycarbonylamino)propyl]-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783.



RMN ^1H (CDCl_3) δ 7,71 (d, 2H), 7,28 (d, 2H), 5,4 (large s, 1H), 3,14-3,20 (m, 2H), 3,03 (t, 2H), 2,36-2,44 (m, 13H), 1,56-1,68 (m, 4H), 1,42 (s, 9H)

Exemple 5 : *4-nitrobenzyl* *N*-[3-(4-{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}piperazin-1-yl)propyl] carbamate (cob 238)

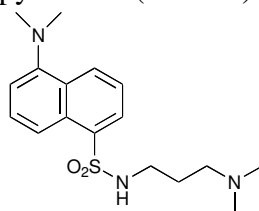
Le composé Cob 238 a été préparé selon le protocole général ci-dessus, à partir de chloroformiate de para-nitrobenzyle et de de 3-[4-(3-tert-butoxycarbonylamino)propyl]-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783.



RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,19 (d, 2H), 7,48 (d, 2H), 6,16 (large s, NH), 5,36 (large s, NH), 5,17 (s, 2H), 3,28 (quad, 2H), 3,13-3,19 (m, 2H), 2,37-2,46 (m, 8H), 1,59-1,72 (m, 4H), 1,42 (s, 9H).

Exemple 6 : *5*-(diméthylamino)-*N*-[3-(diméthylamino)propyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 221)

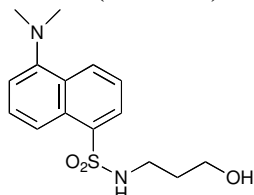
Le composé Cob 221 préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et de N,N-diméthylaminopropyl amine (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,49-8,52 (m, 1H), 8,28-8,31 (m, 1H), 8,21-8,23 (m, 1H), 7,49-7,56 (m, 2H), 7,16 (d, 1H), 2,95 (t, 2H), 2,87 (s, 6H), 2,21 (t, 2H), 2,16 (t, 6H), 1,55 (quint, 2H)

Exemple 7 : 5-(diméthylamino)-N-[3-hydroxypropyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 220)

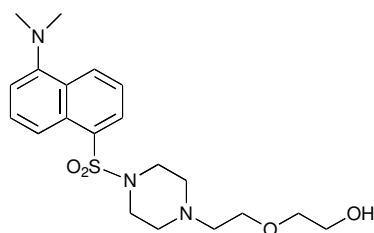
Le composé Cob 220 a été préparé selon le protocole général, à partir de chlorure de dansyle et de 3-hydroxypropylamine (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,56 (d, 1H), 8,24-8,31 (m, 2H), 7,50-7,60 (m, 2H), 7,20 (d, 1H), 5,20 (m, 1H), 3,66 (large m, 2H), 3,06 (quad, 2H), 2,80 (s, 6H), 1,64 (quint, 2H)

Exemple 8 : 2-(2-{4-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl]pipérazin-1-yl}éthoxy)éthan-1-ol (cob 224)

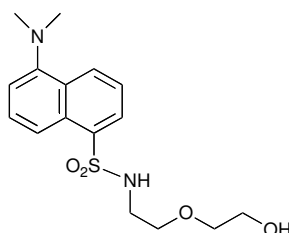
Le composé Cob 224 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et de 1-[2-(2-Hydroxyéthoxy)éthyl]pipérazine (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,55 (d, 1H), 8,41 (d, 1H), 8,17 (d, 1H), 7,48-7,54 (m, 2H), 7,16 (d, 1H), 3,49-3,62 (m, 6H), 3,22-3,25 (m, 4H), 2,87 (s, 6H), 2,53-2,57 (m, 6H)

Exemple 9 : 2-[2-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido]éthoxy]éthan-1-ol (cob 225)

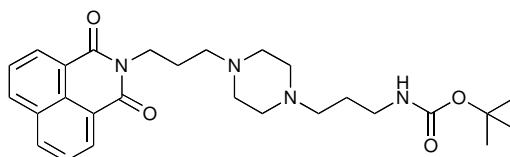
Le composé Cob 225 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et de 2-(2-Aminoethoxy)ethanol (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,57 (d, 1H), 8,25-8,32 (m, 2H), 7,5-7,6 (m, 2H), 7,21 (d, 1H), 5,25 (m, 1H, NH), 3,57 (t, 2H), 3,39 (t, 2H), 3,31 (t, 2H), 3,13, (m, 2H), 2,91 (s, 6H).

Exemple 10 : *N*-{3-[4-(3-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide (cob 227)

Le composé Cob 227 a été préparé selon le protocole général à partir d'anhydride naphthalique et de 3-[4-(3-*tert*-butoxycarbonylamino)propyl]-pipérazin-1-yl]propylamine. Celle-ci a été préparée selon Ryckebusch et al, Bioorg Med Chem Lett, 2003, 13, 3783.

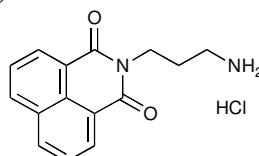


Tfus=196-198°C

RMN ^1H (300Hz CDCl_3) : δ 8,60-8,63 (m, 2H), 8,21-8,24 (m, 2H), 7,75-7,80 (m, 2H), 5,44 (s, 1H, NH), 4,42-4,30 (m, 2H), 3,15-3,10 (m, 2H), 2,50-2,57 (m, 8H), 2,38-2,41 (m, 4H), 1,92-2,06 (m, 2H), 1,60-1,69 (m, 2H), 1,44 (s, 9H)

Exemple 11 : *N*-(3-aminopropyl)-1,8-naphtalimide hydrochloride (cob 226)

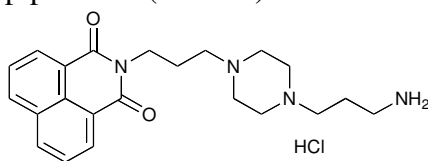
Le composé Cob 226 a été préparé à partir d'anhydride naphthalique et d'un large excès de diaminopropane (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz DMSO): δ 8,49-8,52 (m,2H), 7,96 (large s), 8,46-8,49 (m,2H), 7,86-7,91 (m,2H), 4,10-4,15 (m, 2H), 2,79-3,04 (m, 2H), 1,94-2,03 (quint, 2H).

Exemple 12 : Chlorhydrate de *N*-{3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide hydrochloride (cob 228)

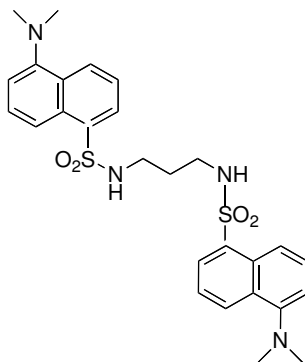
Le composé Cob 228 a été préparé à partir d'anhydride naphthalique et d'un large excès de bis(3-aminopropyl)pipérazine (Aldrich).



RMN ^1H (300Hz DMSO): δ 8,46-8,52 (m, 4H), 8,12 (broad s), 7,86-7,91 (m, 2H), 4,12-4,16 (t, 2H), 3,2-3,6 (broad m, 14H), 2,14-2,16 (m, 2H), 1,98-2,00 (m, 2H)

Exemple 13 : 1,3-bis [5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido] diaminopropane (05-06-L-F11)

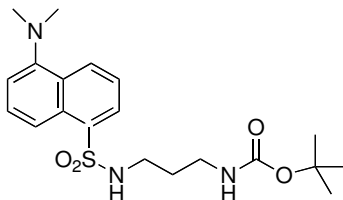
Le composé 05-06-L-F11 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et de 1,3-diaminopropane (Aldrich).



RMN ^1H (200Hz CDCl_3): δ 8,40-7,00 (m, 12H), 4,80 (t, 2H), 2,80 (m, 16H), 1,35 (quint, 2H).

Exemple 16 : N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamino-propane (05-102-L-B09)

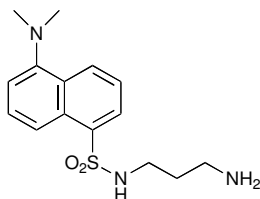
Le composé 05-102-L-B09 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et de tert-butyl 3-aminopropylcarbamate (Aldrich).



RMN ^1H (200Hz CDCl_3) : δ 8,50 (d, 1H), 8,30 (d, 1H), 8,20 (d, 1H), 7,50 (m, 2H), 7,20 (d, 1H), 5,70 (br t, 1H), 4,50 (br t, 1H), 2,85 (s, 6H), 3,05 and 2,90 (2m, 4H), 1,50 (m, 2H), 1,35 (s, 9H).

Exemple 17 : N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-1,3-diamino-propane (05-06-L-D03)

Le composé 05-06-L-D03 a été préparé selon le protocole général à partir de chlorure de dansyle et d'un large excès de 1,3-diaminopropane.

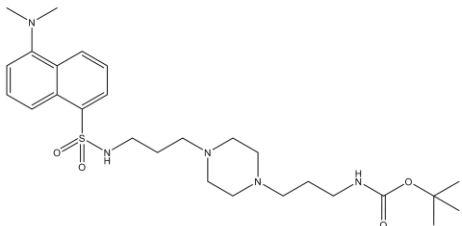
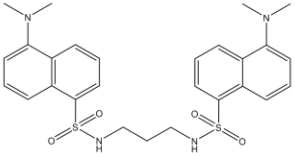
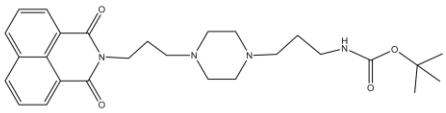
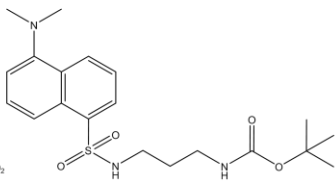
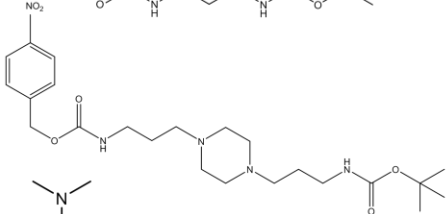
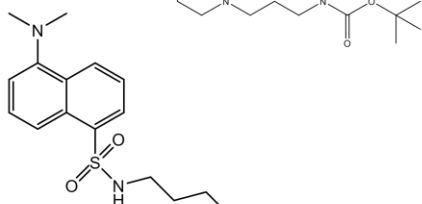
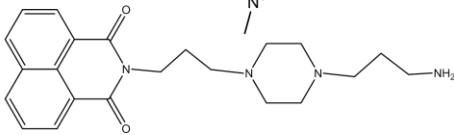
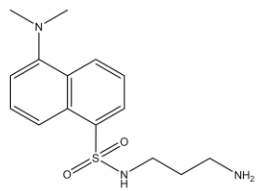
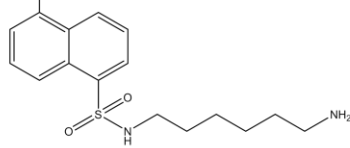


RMN ^1H (200Hz CDCl_3) : δ 8,50 – 7,00 (m, 6H, m), 3,80 (large m, 3H), 2,95-2,60 (m, 10H), 1,40 (q, 2H)

Exemple 18 : Criblage de molécules anti-angiogéniques à partir d'une bibliothèque

La bibliothèque de composés chimiques du Département de Chimie Moléculaire (CNRS UMR 5250, University Joseph Fourier Grenoble) composée de 1360 molécules a été criblée au moyen d'un test cellulaire d'angiogenèse adapté.

La plupart des molécules antiangiogéniques ont la capacité d'inhiber la fermeture spontanée d'une blessure réalisée en griffant une monocouche de cellules endothéliales avec la pointe d'une pipette. Afin d'adapter ce test de « fermeture de blessure » à la contrainte d'un criblage à grande échelle, une lignée fluorescente de cellules endothéliales microvasculaires a été générée par infection d'un rétrovirus défectif codant eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) dans la lignée cellulaire HMEC-1 immortalisée. Afin de sélectionner les molécules qui affecteront sélectivement la migration cellulaire endothéliale et d'exclure les molécules qui interfèrent avec les mécanismes généraux de la migration cellulaire dans tout type de cellule, une lignée cellulaire de fibroblastes fluorescents a également été générée en réalisant une transduction rétrovirale du gène eGFP dans les fibroblastes 3T3 de souris. Toutes les molécules ont ensuite été testées en triple sur des cellules à une concentration de 25 μM dans des plaques 96 puits. Les molécules inhibant la fermeture de la blessure ont ensuite été testées à nouveau dans des conditions similaires sur des cellules 3T3. Les résultats sont rapportés sur le tableau 1 ci-dessous. La molécule la plus efficace, COB 223, inhibe la migration des cellules endothéliales avec un EC_{50} de 5 μM tandis que son EC_{50} est de 25 μM sur la fermeture de blessure de cellules 3T3. De façon intéressante, certaines molécules telles que COB 227 apparaissent moins actives sur des cellules endothéliales (EC_{50} = 18 μM) mais beaucoup plus spécifiques (EC_{50} pour des cellules 3T3 = 250 μM).

	Formules	IC50 HMEC-GFP	IC50 3T3-GFP
COB223		5 μ M	25 μ M
05-06-L-F11		15 μ M	40 μ M
COB227		18 μ M	250 μ M
05-102-L-B09		18 μ M	150 μ M
COB238		20 μ M	> 50 μ M
COB221		20 μ M	150 μ M
COB228		25 μ M	40 μ M
05-06-L-D03		25 μ M	200 μ M
W7		35 μ M	35 μ M

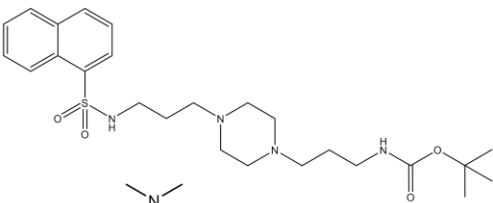
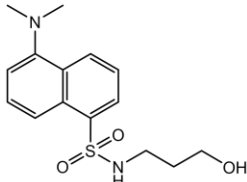
COB235		40 μ M	> 50 μ M
COB220		40 μ M	> 50 μ M

Tableau 1

Exemple 19 : Effet de COB 223 dans différents tests d'angiogénèses in vitro

L'activité du composé COB 223 et du composé 05-06-F11, le deuxième analogue le plus efficace, a ensuite été testée dans une série de tests d'angiogénèse *in vitro*. En premier lieu, les cellules HMEC-1 ont été cultivées sous forme de sphéroïdes, transférées dans un gel de collagène, puis on a laissé croître ces cellules en présence soit de leur sérum (**Figure 2**) soit de FGF-2 (**Figure 3**). Il a été observé que les deux molécules inhibent de façon importante la croissance cellulaire endothéliale à une concentration de 10 μ M, quelque soit le facteur stimulant en présence.

Un autre test développé dans le laboratoire des inventeurs, utilisant la capacité des cellules souches embryonnaires murines de se différencier en cellules de la lignée endothéliale (vasculogénèse) et de former des bourgeons endothéliaux (angiogénèse) lorsqu'elles sont cultivées en tant que corps embryonnaires dans des gels de collagène tri-dimensionnels. Comme il apparaît sur la **Figure 3**, COB 223 et 05-06-L-F11 n'affectent pas la différenciation endothéliale des cellules ES mais bloque complètement la formation des bourgeons endothéliaux (CD31-positif).

L'effet des composés 05-06-F11 et COB 223 sur la prolifération des cellules endothéliales à travers l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux à fluorescence (FACS) a également été étudié. Afin d'évaluer tout effet pro-apoptotique potentiel, les cellules adhérentes et en suspension ont été analysées. Les cellules endothéliales cultivées en l'absence de sérum ont été stimulées avec 10% de sérum de veau fœtal en l'absence et en présence des composés (cf. Tableau 2). Aucun changement n'a été observé dans le pourcentage de cellules apoptotiques ou nécrotiques (pre-G1) tandis que les deux composés diminuent très fortement le nombre de cellules engagées dans la phase S (de 20 % à moins de 8%). Ces composés apparaissent ainsi comme étant des agents antiprolifératifs pour les cellules HMVECDs.

HMVEC-d		% Sub-G1	% G1	% S	% G2
Absence de sérum	DMSO	0,6	1,6	9,4	3,4

FCS	DMSO	0,3	6	1	1
			5,3	9,7	4,7
FCS	COB223	0,5	8	7	3
			8,2	,6	,7
FCS	05-06-L- F11	0,3	8	7	3
			8,4	,6	,7

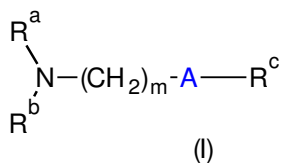
Tableau 2 : Analyse du cycle cellulaire sur des cellules HMVEC-d traitées avec les composés 05-06-L-F11 ou COB 223.

Exemple 20 : Effets du COB 223 sur la formation de la tumeur *in vivo*

Dans la mesure où la croissance de nombreuses tumeurs *in vivo* dépend de l'angiogenèse, il a été vérifié si la molécule anti-angiogénique COB 223 était capable de réduire la croissance de la tumeur. Les inventeurs ont utilisé des cellules TS/A, des cellules de tumeurs mammaires murines exprimant la luciférase, qu'ils ont injectées à des souris nude par voie sous-cutanée. 5 mg de COB 223 ou de son véhicule (4% de DMSO dans le PBS) ont été injectés ip chaque jour à des souris porteuses de tumeurs TS/A-luc du jour 7 jusqu'au jour 18. Comme il apparaît sur la **Figure 4**, l'injection de COB 223 réduit significativement la croissance de tumeurs TSA comme mesuré par la taille totale des tumeurs et la quantité de cellules tumorales vivantes mesurées au jour 15 par imagerie par bioluminescence non-invasive. La différence dans la taille des tumeurs est statistiquement significative ($p < 0,05$) du jour 9 jusqu'au jour 17.

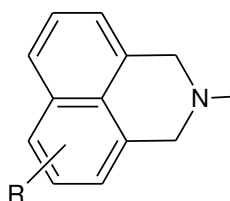
REVENDEICATIONS

1. Composé de formule (I) pour son utilisation pour inhiber l'angiogenèse :



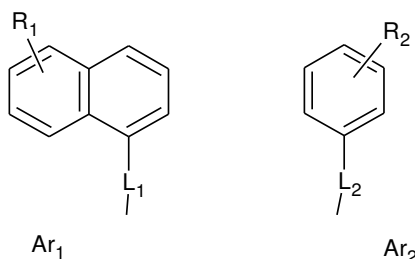
dans laquelle :

NR^aR^b représente un groupement choisi parmi $NHAr$, ou un groupe



R représente un groupement choisi parmi H, Cl, Br, I, F, NO_2 , $NR_{10}R_{11}$, N_3 , OR_{12} ;

Ar représente un groupement choisi parmi Ar_1 ou Ar_2



L_1 , L_2 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi $-SO_2-$, $-CH_2-OC(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-OC(=O)-$, $C(=O)-$, $-CH_2-SC(=S)-$;

R_1 , R_2 , identiques ou différents, sont choisis parmi H, Cl, Br, alkyle en C_1-C_6 , NO_2 , NR_3R_4 , OR_{13} ;

R_3 , R_4 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi H ou alkyle en C_1-C_6 ;

A représente un groupement choisi parmi une liaison ou un groupe Het – $(CH_2)_n-$, le groupe Het désignant un groupement hétérocyclyle de 5 à 7 chaînons ;

R^c représente un groupement choisi parmi OR_5 , ou NR_6R_7 ;

R_5 représente un groupement choisi parmi H, $-(CH_2)_p-OH$, alkyle en C_1-C_6 , $C(=O)R_{14}$;

R_6, R_7 , identiques ou différents, représentent indépendamment un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , $C(=O)OR_8$, $NHSO_2R_9$;

R_8 représente un groupement choisi parmi H ou C_1-C_6 alkyle ;

R_9 représente un groupement choisi parmi aryle en C_6-C_{10} éventuellement substitué par un ou plusieurs groupes R_1 ;

R_{10}, R_{11} , identiques ou différents, représentent un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , ou aryle en C_6-C_{10} , ou bien R_{10} et R_{11} forment ensemble, avec l'atome d'azote auxquels ils sont attachés, une amine cyclique ;

R_{12}, R_{13}, R_{14} identiques ou différents, représentent chacun indépendamment un groupement choisi parmi H, alkyle en C_1-C_6 , aryle en C_6-C_{10} ;

m est un entier de 1 à 6 ;

n est un entier de 1 à 6 ;

p est un entier de 1 à 4 ;

ou un sel pharmaceutiquement acceptable de celui-ci.

2. Composé de formule (I) pour son utilisation selon la revendication 1, dans le traitement et/ou la prévention des cancers, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinopathie diabétique, le psoriasis ou l'arthrite rhumatoïde.

3. Composé de formule (I) pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle Ar est un groupe Ar_1 .

4. Composé de formule (I) pour son utilisation selon la revendication 3, dans laquelle L_1 est un groupe $-SO_2-$.

5. Composé de formule (I) pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle R_1 est NR_3R_4 , de préférence $N(CH_3)_2$.

6. Composé de formule (I) pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle $m=3$.

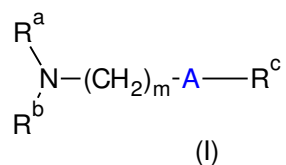
7. Composé de formule (I) pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, dans laquelle $n=3$.

8. Composé de formule (I) pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes choisi parmi :

- tert-butyl 3-(4-(3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 223)
- tert-butyl 3-(4-(3-(naphthalène-1-sulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 235)
- tert-butyl 3-(4-(3-phénylamidopropyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 237)
- tert-butyl 3-(4-(3-(4-méthylphénylsulfonamido)propyl)pipérazin-1-yl)propylcarbamate (cob 236)
- 4-nitrobenzyl N-[3-(4-{3-[(tert-butoxycarbonyl)amino]propyl}pipérazin-1-yl)propyl] carbamate (cob 238)
- 5-(diméthylamino)-N-[3-(diméthylamino)propyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 221)
- 5-(diméthylamino)-N-[3-hydroxypropyl]naphthalène-1-sulfonamide (cob 220)
- 2-(2-{4-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl]pipérazin-1-yl}éthoxy)éthan-1-ol (cob 224)
- 2-{2-[5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido]éthoxy}éthan-1-ol (cob 225)
- N-{3-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide (cob 227)
- Chlorhydrate de N-(3-aminopropyl)-1,8-naphtalimide (cob 226)
- Chlorhydrate de N-{3-[4-(3-aminopropyl)pipérazin-1-yl]propyl}-1,8-naphtalimide (cob 228)
- 1,3-bis(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)- propane (05-06-L-F11)
- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamiopropane (05-102-L-B09)
- 3-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-propylamine (05-06-L-D03)
- Dansylcadavérine-6-(5-chloro-naphthalène-1-sulfonamido)hexylamine (W7)
- 1,4-bis[(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl]pipérazine (Cob 222)

9. Composition pharmaceutique comprenant un composé de formule (I) tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 8, en association avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

10. Composé de formule (I) :



R^a , R^b , R^c , A et m étant tels que définis dans l'une quelconque des revendications 1 à 8,

A l'exclusion des composés :

- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonyl)-N'-(tert-butoxycarbonyl)-1,3-diamino-propane (05-102-L-B09)
- N-(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)-1,3-propylamine (05-06-L-D03)
- 6-(5-chloro-naphthalène-1-sulfonamido)hexylamine (W7)
- 1,4-bis[(5-(diméthylamino)naphthalène-1-sulfonamido)propyl]pipérazine (Cob 222)
- Dansylcadavérine

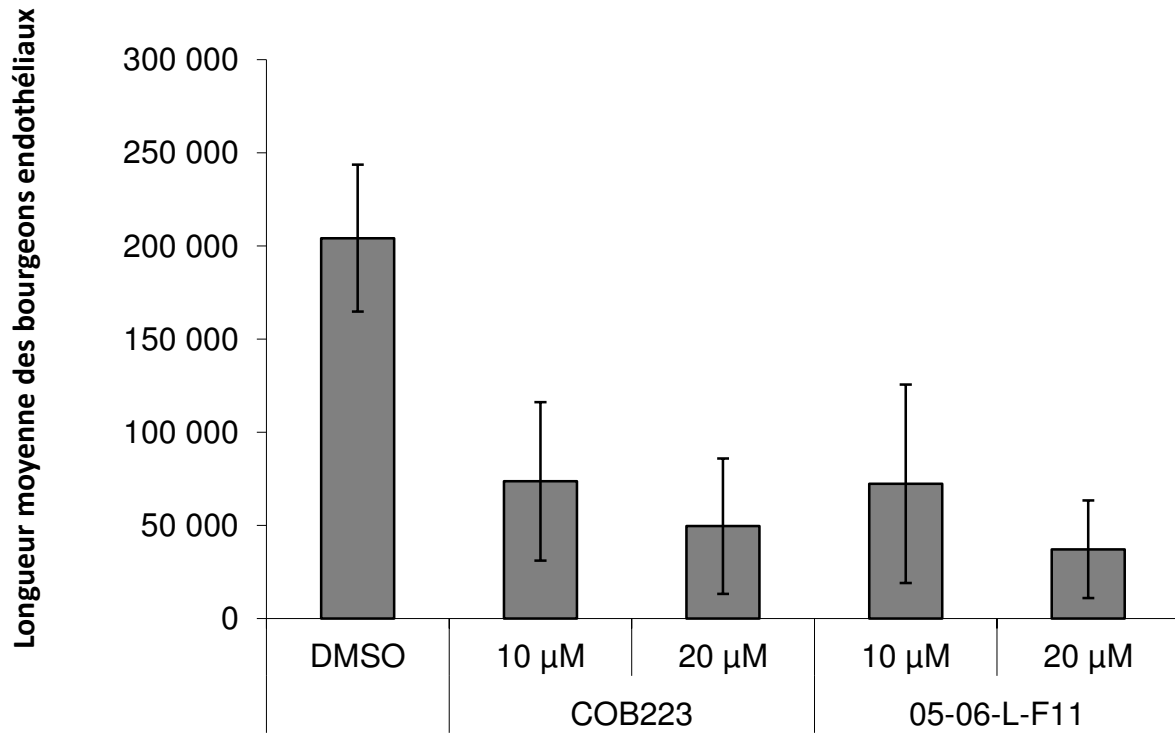


FIG. 1

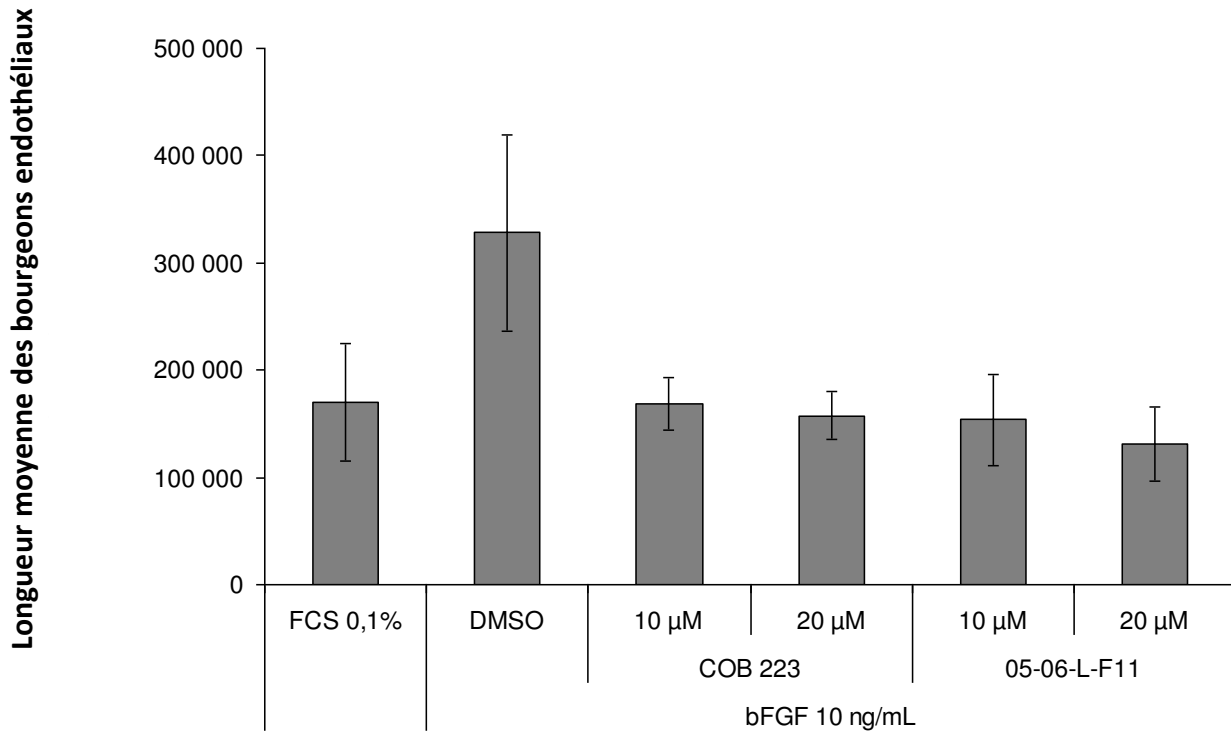


FIG. 2

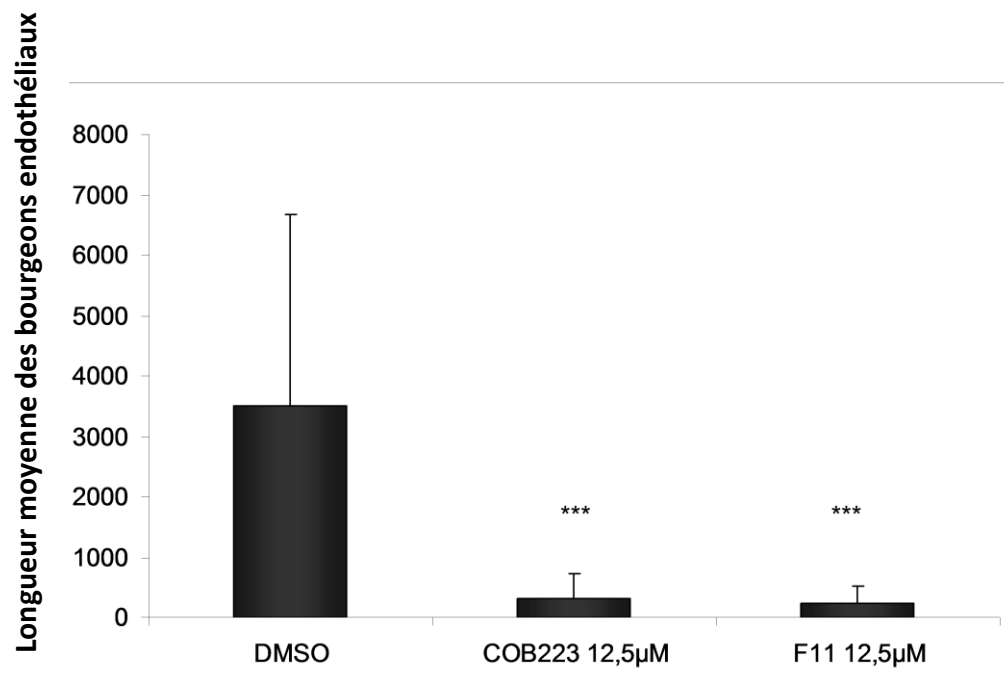


FIG. 3

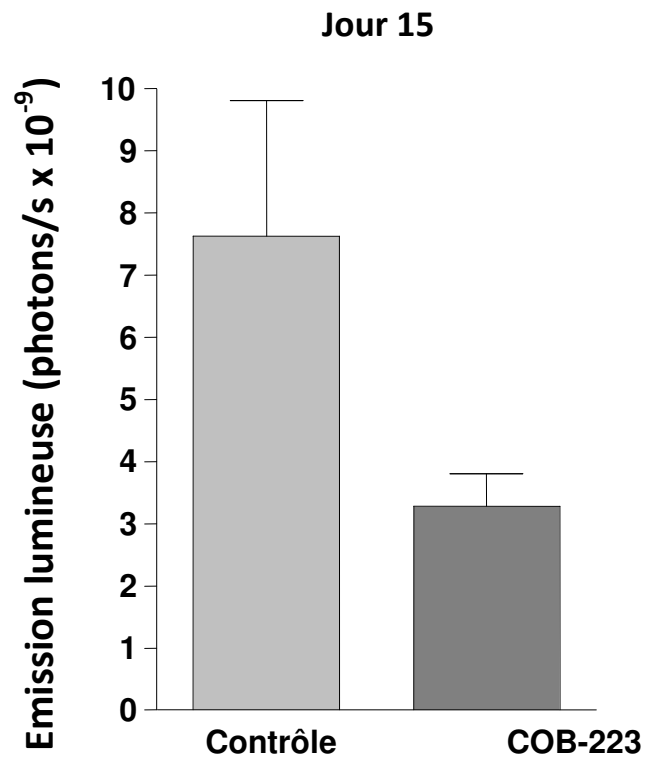
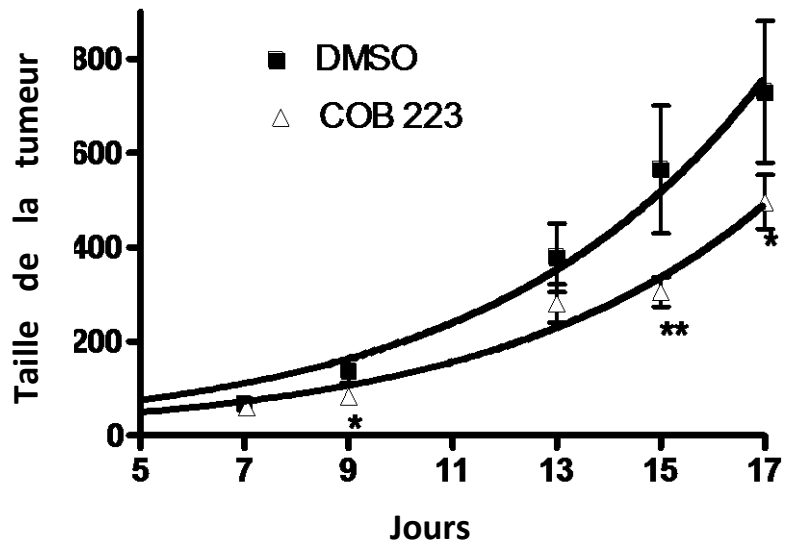


FIG. 4

Inhibition de l'angiogenèse tumorale : criblage d'une chimiothèque et caractérisation d'un nouveau composé agissant sur la voie de signalisation Ras-ERK.

Au cours des dernières années, des thérapies anti-cancéreuses ciblant l'angiogenèse tumorale ont été développées et ont démontré un bénéfice en terme de survie globale pour les patients atteints de certains cancers métastatiques. Cependant, dans de nombreux cas, les tumeurs acquièrent des résistances échappent au traitement. Le développement de nouveaux composés anti-angiogène est donc une réelle nécessité pour être proposés en seconde ligne thérapeutique. Dans ce travail, notre objectif était d'identifier de nouvelles molécules anti-angiogènes par le criblage à haut débit, de la chimiothèque académique de l'Université de Grenoble. Nous avons adapté le test de blessure sur cellules endothéliales au format des plaques de 96 puits et avons identifié une famille de molécules qui inhibent spécifiquement leur fermeture. L'activité anti-angiogène de la molécule leader (COB223) a été confirmée dans des modèles d'angiogenèse tridimensionnels *in vitro*, et, chez la souris, dans un modèle d'angiogenèse sous-cutanée. Nous avons testé l'activité anti-tumorale de COB223 dans un modèle de xénogreffe chez la souris et observé une diminution significative de la taille des tumeurs dans les souris traitées. A la recherche de son mécanisme d'action, nous avons observé que COB223 inhibe la prolifération cellulaire et diminue les phosphorylations de MEK et Raf, de ERK1/2 induites par le VEGF-A dans les cellules endothéliales. Nous avons également montré que COB223 n'inhibe pas les phosphorylations du VEGFR2 et de PLC γ . D'après ces résultats, nous proposons que la cible de COB est localisée dans la voie de signalisation VEGF/ PLC γ /PKC/ERK entre PKC et Ras.

Mots Clés : angiogenèse, criblage à haut débit, récepteur du VEGF, signalisation ERK, thérapie anti-angiogène, cellule endothéliale

Inhibition of tumor angiogenesis: screening of a chemical library and characterization of a new compound that targets the Ras-ERK signaling pathway.

Several anti-tumoral therapies targeting angiogenesis have been developed over the recent years and have demonstrated benefits for several metastatic cancers. However, in many cases, resistances to these treatments appear over time, allowing tumor escape. The development of new anti-angiogenic compounds is thus dramatically urged in order to propose second-line anti-angiogenic treatments. In this work, our aim was to identify new anti-angiogenic compounds through high throughput screening of the academic library from the University of Grenoble. We adapted the endothelial cell scratch assay to 96-well plates. We identified a family of molecules that specifically inhibited endothelial cell migration. The anti-angiogenic activity of the leader molecule (COB223) was confirmed *in vitro* in 3D cellular models of angiogenesis and *in vivo* using a mouse model of subcutaneous sponge implantation. We tested the anti-tumoral activity of COB223 on a mouse xenograft model. We observed that tumor growth was significantly reduced in treated mice correlated with decreased microvessel density. In search for its mechanism of action, we observed that COB223 inhibits cell proliferation and reduces VEGF-A-induced phosphorylation of MEK and ERK1/2 in endothelial cells. We also showed that COB223 did not affect VEGFR2 and PLC γ phosphorylation but reduces Raf phosphorylation responsible for its activity. These results allow us to propose that the molecular site of action of COB223 is located in the VEGF/ PLC γ /PKC/ERK pathway, between PKC and MEK.

Key words : angiogenesis, high throughput screening, VEGF receptor, ERK pathway, anti-angiogenic therapy, endothelial cell.