

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Université des Frères Mentouri Constantine  
جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
Faculté des Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale



## THÈSE

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : Physiologie Cellulaire et Moléculaire

Option : Signalisation et Cancer

## THEME

***Effets de l'homocystéine sur les processus angiogéniques et  
l'invasion tumorale du tissu endothélial in vivo et in vitro***

Présentée Par

**AGGOUN Chérifa**

**Devant le jury :**

<b>Président :</b>	<b>Pr. SATTI Dalila</b>	Université des Frères Mentouri ; Constantine
<b>Rapporteur :</b>	<b>Pr. NAIMI Dalila</b>	Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie ; Constantine
<b>Examineurs :</b>	<b>Pr. OUCHER Bakhouch</b>	Université Ferhat Abbas ; Sétif
	<b>Pr. MERAIHI Zahia</b>	Université des Frères Mentouri ; Constantine
	<b>Dr. BOUDA Abd el Nasser</b>	Ecole Nationale Supérieure de Biotechnologie ; Constantine



# *Dédicaces*

*A mon Mari  
pour sa patience et son soutien*

*A mes parents, ma belle mère, mes sœurs , mes frères et mon amie Souad  
pour leur soutien, leurs sacrifices et leur amour, je leur dédie cette thèse.*

# *Remerciements*

*Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, **Pr. Naïmí dalíla** qui m'a accueilli au sein de son équipe et m'a confié ce sujet de thèse. Merci de m'avoir encadré, accompagné au cours de ces dernières années, de m'avoir transmis une partie de vos connaissances.*

*Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à l'ensemble des membres du jury, Madame Satta Dalila, Madame Meraihi Zahia, Mr Houcher Bakhouche, et Mr BOUDHA Abdel Nasser pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.*

<b>Problématique</b> .....	1
<b>Chapitre 1 : Revue Bibliographique</b>	
<b><u>1-L'Angiogenèse</u></b> .....	4
<b>1.1-Définition</b> .....	4
<b>1.2-Formation d'un nouveau capillaire</b> .....	4
1.2.1- L'endothélium : Les CEs.....	4
1.2.2- L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire.....	6
<b>1.3-L'angiogenèse tumorale</b> .....	8
1.3.1-Notion de commutation ou « switch » angiogénique.....	10
1.3.2- Régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale.....	11
<b><u>2-VEGF-A et induction de l'angiogenèse</u></b> .....	13
<b>2.1- Le VEGF-A</b> .....	13
2.1.1-Gène du VEGF-A.....	13
2.1.2-Structure protéique et isoformes.....	14
2.1.3-Régulation transcriptionnelle.....	15
2.1.4- Fonctions biologiques du VEGF-A.....	17
<b>2.2- les récepteurs VEGF-A et signalisation</b> .....	18
<b>2.3- Angiogenèse et contrôle hypoxique du VEGF-A</b> .....	22
2.3.1-Hypoxie tissulaire.....	22
2.3.2-Le système HIF.....	22
2.3.3-Interaction VEGF-A et HIF-1 $\alpha$ .....	25
<b><u>3-Modulation thérapeutique de l'angiogenèse</u></b> .....	25
<b>3.1- Les modèle d'étude</b> .....	25
3.1.1-Modèles <i>in vitro</i> .....	25
3.1.2- Modèles <i>in vivo</i> .....	28
<b>3.2-Thérapie anti-angiogénique</b> .....	29
3.2.1-Le concept des –INIB et des –UMAB.....	29
3.2.2-La stratégie anti-VEGF.....	30
3.2.3-La stratégie anti-récepteur du VEGF.....	31
3.2.4-Stratégie anti- signalisation.....	31
<b><u>4-Homocystéine</u></b> .....	32
<b>4.1-Métabolisme cellulaire de l'homocystéine</b> .....	32
4.1.1-Les voies de la reméthylation.....	32
4.1.2-La voie de la transulfuration.....	32



<b>4.2-Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes</b> .....	33
<b>4.3- Effet de l'homocystéine sur l'endothélium</b> .....	36
4.3.1-Stress oxydatif.....	36
4.3.2-L'apoptose.....	36
4.3.3-Hypométhylation.....	37
<b>4.4-Homocystéine et angiogenèse : Etat de connaissance</b> .....	38
<b>Chapitre 2 : Matériels et Méthodes</b>	
<b><u>1-Etude <i>in vivo</i></u></b> .....	39
<b>1.1-Matériel biologique</b> .....	39
1.1.1-Choix et entretien du modèle animal.....	39
1.1.2- Traitement des animaux.....	40
<b>1.2- Analyse biochimique</b> .....	40
<b>1.3-Analyse Hématologique (cytologique)</b> .....	42
<b>1.4-Etude Histologique</b> .....	42
<b>1.5- Révélation du VEGF-A par marquage immunohistochimique</b> .....	43
<b>1.6- Quantification de l'expression aortique des gènes (VEGF et HIF-1<math>\alpha</math>) par La qRT-PCR</b> .....	47
<b><u>2- Etude <i>in vitro</i></u></b> .....	52
<b>2.1-Matériel biologique</b> .....	52
2.1.1-L'aorte du rat.....	52
2.1.2-lignée cellulaire.....	52
<b>2.2- Expérimentations</b> .....	53
<b><u>2.2.1-Evaluation de l'effet d'homocystéine sur l'angiogenèse</u></b> .....	53
<b><i>A- Gamme cytotoxique de l'homocystéine</i></b> .....	53
A.1- Modèle de l'anneau aortique (Aortic Ring Assay).....	53
A.2- Test de prolifération des HUVECs.....	54
A.3- Test de migration des HUVECs par cicatrisation.....	54
<b><i>B-Gamme physiopathologique de l'Hcy</i></b> .....	55
B.1- Test de prolifération des HUVECs.....	55
B.2- Test de migration des HUVECs.....	56
<b><u>2.2.2- Evaluation de l'effet d'Hcy sur l'expression génique du VEGF et de l'OPN</u></b> .....	56
<b><u>3-Analyse statistique</u></b> .....	57

## Chapitre 3 : Résultats

<b><u>1-Résultat relatifs à l'étude <i>in vivo</i></u></b> .....	58
1.1-Détermination du taux plasmatique d'Hcy.....	58
1.2-Evaluation du statut inflammatoire.....	58
1.3- Effet de l'hyperhomocystéinémie sur le MDA.....	60
1.4-Effet de l'hyperhomocystéinémie sur le profil hématologique.....	61
1.5-Résultats de l'étude histologique.....	62
1.6- Mise en évidence du VEGF-A dans le thymus.....	65
1.7-Effet sur l'expression génique du VEGF-A et de l'HIF-1 $\alpha$ au niveau aortique.....	66
<b><u>2-Résultat relatifs à l'étude <i>in vitro</i></u></b> .....	67
2.1-L'homocystéine inhibe l'angiogenèse bourgeonnante.....	67
2.2-l'homocysteine inhibe la prolifération des HUVECs.....	69
2.3-L'homocystéine inhibe la migration des HUVECs.....	73
2.4-L'homocystéine inhibe l'expression génique du VEGF-A et de l'OPN des HUVECs.....	78
<b>Chapitre4 : Discussion</b> .....	80
<b>Conclusion</b> .....	91
<b>Références Bibliographiques</b> .....	92

# *Problématique*

L'angiogenèse est définie comme étant le résultat de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins provenant de la vasculature déjà présente et d'un processus multiple comprenant la prolifération des cellules endothéliales (CEs), leur migration et la formation d'un plexus vasculaire supporté par les péricytes et les constituants de la membrane basale. Ces processus sont cruciaux pour la croissance et l'invasion tumorales (Carmeliet *et al.*, 2011).

Dès les années 1900, les chercheurs ont mis en évidence que les cellules tumorales communiquent avec les cellules de l'organisme hôte, elles sont capables de stimuler la prolifération de nouveaux capillaires (10 à 40% des cellules de la tumeur sont des cellules endothéliales). Ce phénomène est commun à un grand nombre de tumeurs et il est indispensable pour la croissance tumorale (Algire *et al.*, 1945).

En 1968, deux équipes ont mis en évidence dans deux modèles différents, que les tumeurs sont capables d'induire la croissance de nouveaux capillaires à distance (Greenblatt *et al.*, 1968 ; Ehrmann *et al.*, 1968). Mais l'essor de l'angiogenèse tumorale a commencé en 1971 avec le travail de Judah Folkman. Il émet l'hypothèse qu'une tumeur au-delà de quelques millimètres cubes a besoin d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins qui lui apporteront l'oxygène et les éléments nutritifs indispensables à son développement. Elle reste dans un état de dormance tant qu'elle sera a-vasculaire (Folkman 1971). Cette idée a marqué le début de la recherche dans le développement des traitements anti-angiogéniques et Folkman fut le premier à parler du concept de thérapie ciblée.

A partir de là, un nombre croissant d'équipes de recherche s'intéresse à ce concept et les travaux valident l'importance de ce mécanisme dans la croissance tumorale avec la découverte du facteur de croissance de l'[endothélium vasculaire](#) (VEGF : *Vascular endothelial growth factor*) ; l'élément clé du processus angiogénique. Dans les années 2000, la découverte de molécules inhibitrices explosent et en 2004 le rêve de Folkman devient réalité avec la mise sur le marché de la première thérapie anti-angiogénique pour le traitement du cancer colorectal : le bévacizumab ; un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF (Hurwitz *et al.*, 2004).

Cependant, le traitement par les anti-VEGF n'était pas toujours bénéfique et ne montrait pas d'amélioration de la survie globale des patients (Goel *et al.*, 2011), d'où la nécessité de chercher ou de développer d'autres molécules angio-inhibitrices capables de répondre correctement au concept de la thérapie ciblée.

Selon Folkmann, La cible ici est la CE, d'autant plus intéressante qu'elle est considérée comme génétiquement très stable et donc moins susceptible de mettre en place des mutations lui permettant d'acquérir des résistances.

D'après la littérature, l'homocystéine (Hcy) est définie comme étant une molécule angiotoxique dont les effets cytotoxiques et apoptotiques sur les CE ont été analysés dans des études *in vivo* et *in vitro* (Matthias 1996 ; Tyagi *et al.*,2006). Cette idée a annoncé le début de la recherche dans le développement de l'angiogenèse pathologique le cas des maladies inflammatoires, la rétinopathie et le cancer qui constitue actuellement une cible de choix pour les chercheurs.

En effet, les premières approches visant à étudier le rôle de l'Hcy dans l'angiogenèse ont procédé par évaluer son implication dans la régulation des taux du VEGF et cela à des concentrations dites cytotoxiques hautement élevées par rapport aux niveaux cliniques. Les rapports qui se découlent sont contradictoires ; pour certains l'Hcy stimule l'expression du VEGF (Meada *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*,2007) et pour d'autres il l'inhibe (Bosch-Marcé *et al.*,2005 ; Zhang *et al.*,2012).

Actuellement, les études tentent toujours à définir cette corrélation et à expliquer ses mécanismes moléculaires en s'intéressant non seulement au gène du VEGF-A et à ses récepteurs, mais aussi aux différents signaux du microenvironnement tumoral capables d'affecter le phénotype des CE et de là les niveaux d'expression du VEGF-A, tels que les oncogènes, les métalloprotéases (MMP), les cellules endothéliales progénitrices (CEP) et l'hypoxie.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier d'une part, l'effet de l'hyperhomocystéinémie sur le processus angiogénique dont les différentes étapes ont été modélisées *in vitro*, suivant des concentrations définies par la littérature comme étant cytotoxiques et physiopathologiques.

Et d'autre part, son implication dans l'invasion tumorale (*in vivo* et *in vitro*) en visant le VEGF en tant que premier coupable de l'établissement et la propagation d'un réseau vasculaire tumoral, ainsi que deux principaux effecteurs de ses voies de signalisations et du microenvironnement tumoral : le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 $\alpha$  ; *Hypoxia inducible factor-1 alpha*) et l'ostéopontine (OPN). Cette dernière est récemment incriminée dans la tumorigenèse (Chakraborty *et al.*, 2008 ; Wu *et al.*, 2013) mais la littérature n'évoque aucun lien avec l'Hcy.

C'est ainsi qu'on a envisagé de présenter dans ce manuscrit une synthèse bibliographique sur le processus angiogénique et le rôle essentiel qu'y jouent le VEGF-A et ses récepteurs. L'accent y est également mis sur l'HIF-1 $\alpha$  et l'OPN en tant que principaux facteurs d'induction de l'angiogenèse tumorale consécutives à l'expression du VEGF-A et aussi en tant que futures cibles thérapeutiques et en fin un état de connaissance sur la relation entre l'homocystéine et l'angiogenèse.

# *Chapitre 1 : Revue Bibliographique*

# **1-L'Angiogenèse**

## **1.1-Définition**

L'angiogenèse est un processus dynamique grâce auquel de nouveaux capillaires sanguins sont formés par excroissance ou bourgeonnement de vaisseaux préexistants. Ce phénomène diffère de la vasculogenèse, résultant de la différenciation des angioblastes pendant l'embryogenèse pour former les vaisseaux sanguins primitifs. Le terme néovascularisation s'applique aux deux processus (Carmeliet *et al.*, 2011).

Le terme angiogenèse a été utilisé pour la première fois en 1787 par le Dr John Hunter. Il provient du Grec « angio » pour vaisseaux et « genèse » pour création. L'angiogenèse intervient non seulement lors du développement embryonnaire, mais aussi chez l'adulte dans des processus physiologiques (la cicatrisation, la vascularisation mammaire et fœto-placentaire) et dans de nombreuses pathologies, notamment lors de la croissance tumorale et de la dissémination de métastases.

## **1.2-Formation d'un nouveau capillaire**

Chez l'homme et les mammifères, les capillaires sont les vaisseaux les plus fins du système artériel (le diamètre de leur lumière est de 5 à 8  $\mu\text{m}$  et celui des couches cellulaires de 1  $\mu\text{m}$ ). Ils sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales (CEs) recouverte de quelques péricytes associés à la membrane basale vasculaire elle-même composée essentiellement de collagène type IV.

### **1.2.1- L'endothélium : Les CEs**

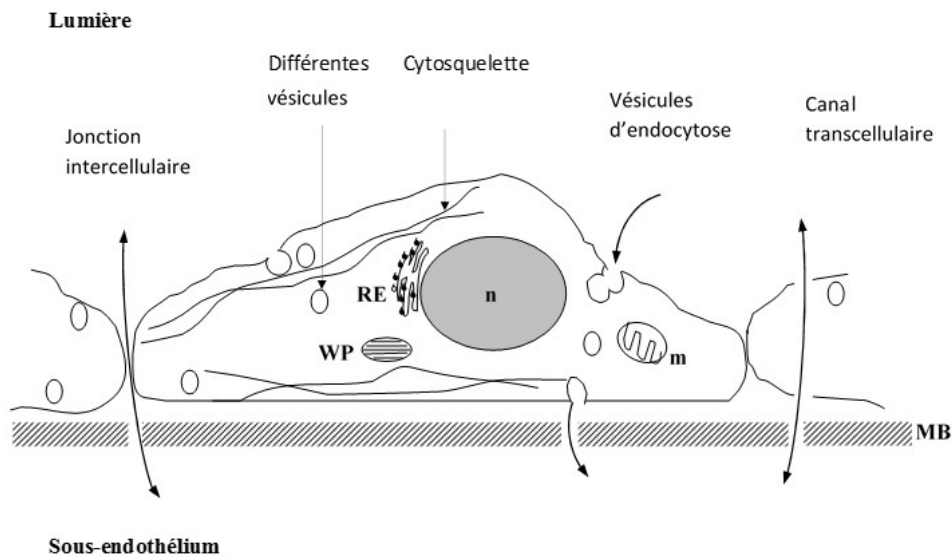
#### **• Structure et propriétés des CEs**

Les CEs sont polarisées, leur paroi basale est ancrée sur la matrice extracellulaire composée de macromolécules de nature collagénique et de protéines adhésives (collagène, fibronectine, facteur von Willebrand). Leur face vasculaire est en contact avec le sang circulant. Physiologiquement elle représente une surface non thrombogène du fait de son organisation et de la production par les cellules des substances anticoagulantes et antiagrégantes plaquettaires.

Elles ont une forme aplatie (0,1-1  $\mu\text{m}$ ) polygonale de quelques micromètres d'épaisseur, 10-15 $\mu\text{m}$  de largeur et 20-50 $\mu\text{m}$  de longueur orientées dans la direction du flux sanguin (Chappey *et al.*, 1997). L'intégrité endothéliale est assurée par des systèmes d'adhérence cellule/cellule et cellule/matrice. Les protéines de la matrice extracellulaire



interagissent avec des récepteurs de la famille des intégrines présents sur la surface endothéliale. L'adhérence entre cellules est contrôlée par des molécules d'adhésion (intégrines, cadhérines, PECAM-1-Platelet endothelial cell adhesive molecule-1). (figure 1)



**Figure 1 : Représentation schématique de la cellule endothéliale.** (D'après Legrand *et al.*, 1987).

Abréviations : m : mitochondrie ; n : noyau ; MB : membrane basale ; RE : réticulum endoplasmique ; WP : corps de Weibel Palade.

● **Fonctions** :

Véritable interface entre le sang et les cellules musculaires lisses de la média, l'endothélium occupe une position anatomique stratégique dans la paroi vasculaire. Ces cellules exercent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions physiologiques fondamentales. Chez l'homme, l'endothélium forme une surface d'échange considérable (5000m<sup>2</sup>) qui module l'homéostasie des vaisseaux en intervenant, notamment, sur la perméabilité, le tonus vasculaire, le système de coagulation et l'angiogenèse (Pries *et al.*, 2006).

Les cellules endothéliales saines maintiennent une balance très fine entre :

- Vasoconstriction et vasodilatation. La régulation de la vasotonie se fait via la sécrétion de substances vasoconstrictrices comme l'endothéline, et via la sécrétion de substances vasorelaxantes comme le monoxyde d'azote (NO).
- Hémostase et thrombose, c'est-à-dire entre l'anti-coagulation et la procoagulation.

- Adhésion et libre circulation des cellules sanguines, c'est-à-dire dans l'équilibre de la réponse immunitaire, par son implication dans la réponse inflammatoire (Sahni, 2007).

### **1.2.2- L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire**

L'initiation du phénomène d'angiogenèse nécessite une modification du phénotype des cellules endothéliales sous l'effet d'une stimulation. Celle-ci peut être physiologique, comme l'hypoxie qui entraîne la sécrétion d'un facteur mitogénique puissant appelé VEGF (vascular endothelial growth factor), ou inflammatoire après une lésion ou une infection, ou encore associée à la présence d'une tumeur invasive (Djonov *et al.*, 2003).

La croissance, l'expansion et le remodelage du plexus vasculaire primaire en un réseau vasculaire mature se produisent lors de deux types de processus d'angiogenèse : bourgeonnement et intussusception (Carmeliet *et al.*, 2011).

#### **●Angiogenèse bourgeonnante**

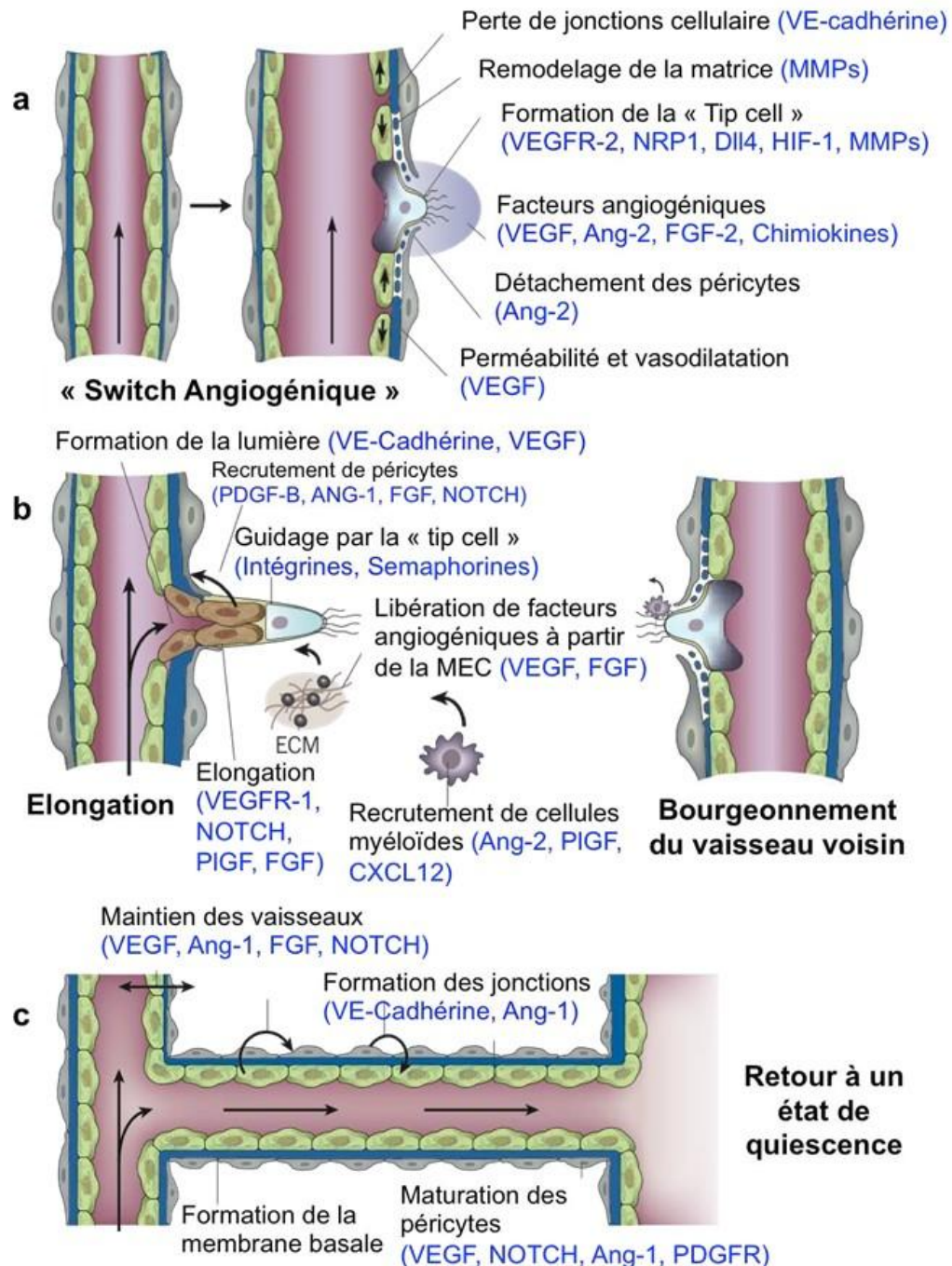
C'est le phénomène le plus courant et le mieux caractérisé. Elle se réalise grâce à la succession de plusieurs étapes qui sont sous la dépendance de facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. Les cellules endothéliales sont les principaux acteurs de ce processus mais d'autres types cellulaires y participent également comme les cellules musculaires lisses, les péricytes, les cellules inflammatoires et les fibroblastes (Coussens *et al.*, 2000).

Les étapes initiales comprennent la vasodilatation du vaisseau parental ce qui réduit la cohésion entre cellules endothéliales adjacentes, la dégradation de la membrane basale et du conjonctif adjacent par des protéases de type métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 ainsi que par les activateurs du plasminogène. Ces enzymes permettent de créer un espace de migration pour les cellules endothéliales et de libérer des facteurs de croissance (FGF-2, VEGF-A) séquestrés dans la matrice extracellulaire (Benjamin *et al.*, 1998), (figure 2A). Les vaisseaux sont ensuite déstabilisés sous l'action de l'angiopoiétine-2 (Ang-2), ligand du récepteur Tie-2 et ainsi antagoniste naturel de l'angiopoiétine-1 (Chang *et al.*, 2001).

Vient ensuite une phase de migration des cellules endothéliales, de prolifération, d'élongation et de mitose puis celle d'assemblage en tubules pour parvenir au bourgeonnement du capillaire (Gerhardt *et al.*, 2003), (figure 2B). La dernière étape consiste en la stabilisation des vaisseaux pendant ce qu'on appelle la phase de maturation : il s'agit du recrutement de

péricytes et de cellules musculaires lisses, ainsi que la formation d'une nouvelle membrane basale (Darland *et al.*, 2001). (figure 2C)

Certains vaisseaux, vont encore évoluer en augmentant leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi. A ce stade, le réseau peut encore régresser complètement en absence du VEGF, sinon il s'implante définitivement et la machinerie de l'angiogenèse s'éteint (Suri *et al.*, 1998).

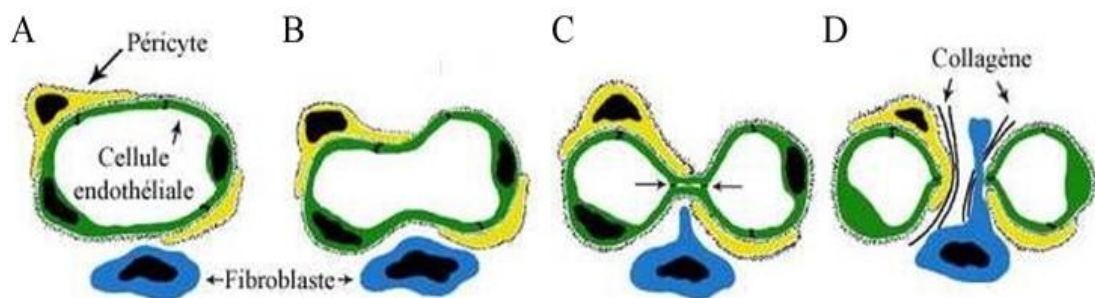


**Figure 2 : Les étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.** (D'après Carmeliet *et al.*, 2011)

Abréviations :NRP-1 ou -2 :neuropiline-1 ou -2 ;Dll4 : delta-like ligand-4 (ligand de notch) ;FGF 2 :Fibroblast Growth Factor 2; CXCL12 : Stromal cell-Derived Factor 1 ; PDFGR :Platelet Derived Growth Factor Receptor .

### •Angiogenèse par intussusception

A la différence de l'angiogenèse bourgeonnante, l'angiogenèse par intussusception ne nécessite pas une prolifération importante des cellules endothéliales mais plutôt un réarrangement des structures préformées. L'intussusception est un processus angiogénique au cours duquel un vaisseau quiescent peut se scinder en deux vaisseaux par compartimentation. (Patan *et al.*, 1996), (figure 3A). Ce processus est initié par une invagination de la paroi du capillaire à l'intérieur de la lumière et aboutit à la création d'une zone de contact entre les deux parois opposées du capillaire (figure 3B). Ce contact entraîne une réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales et la formation d'une séparation interstitielle qui est rapidement envahie par des péricytes ou des myofibroblastes (figure 3C). Ces cellules péri-capillaires vont alors synthétiser une matrice extracellulaire permettant d'augmenter la séparation entre les deux vaisseaux néoformés (Djonov *et al.*, 2003). (figure 3D)

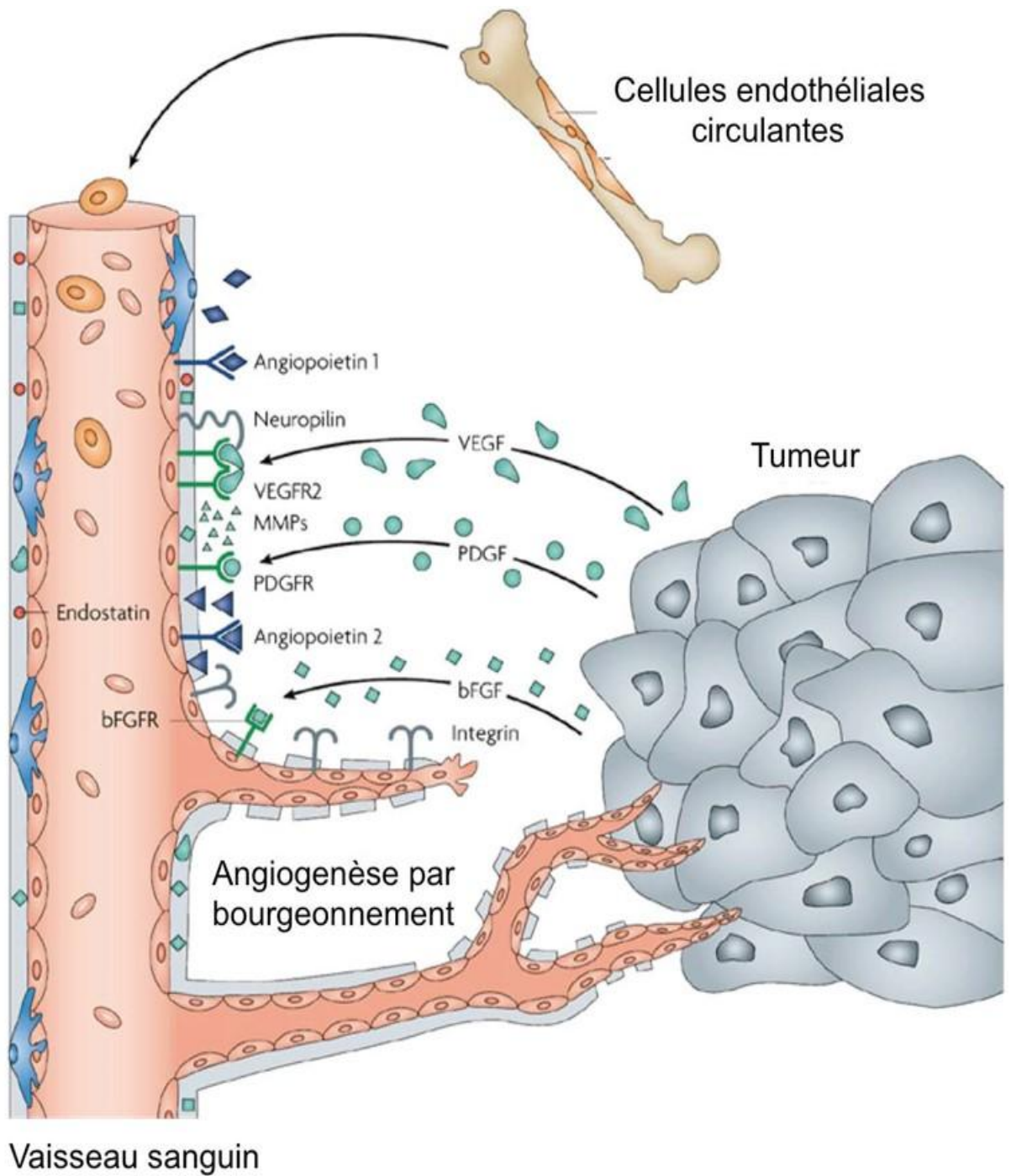


**Figure 3 :** Les étapes de l'angiogenèse par « intussusception ». (D'après Djonov *et al.*, 2003)

### 1.3-L'angiogenèse tumorale

La progression et la propagation tumorales nécessitent l'induction d'une angiogenèse appelée « switch angiogenic » ou commutation angiogénique qui sépare deux phases de ce développement tumoral.

Dans la première phase dite pré invasive, une tumeur maligne ne peut dépasser 1 à 2 millimètres de diamètre si elle n'est pas en mesure d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins susceptibles de lui apporter l'oxygène et les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance et d'éliminer ses déchets. Ces masses tumorales oscillent entre prolifération et apoptose. Dans la deuxième phase, une vascularisation massive des tumeurs permet à celles-ci de devenir invasives et métastatiques (Papetti *et al.*, 2002). (figure 4)



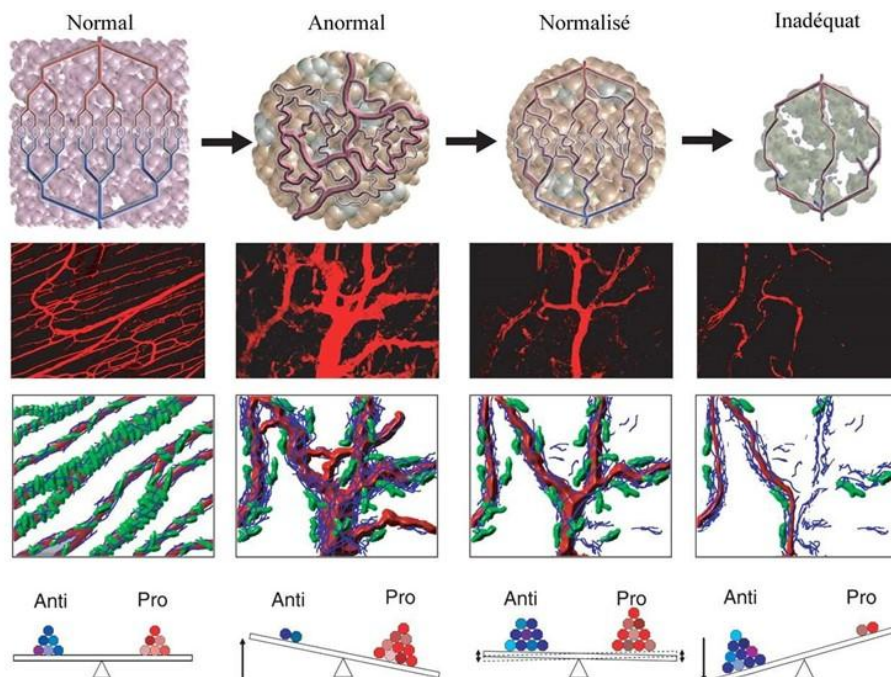
**Figure 4** : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale.(D'après Folkman, 2007)



### 1.3.1-Notion de commutation ou « switch »angiogénique

En 1945, Algire propose que l'acquisition par les cellules tumorales de la capacité à induire la croissance de nouveaux vaisseaux est une étape significative de la tumorigenèse (Algire *et al.*,1945). En 1971, Folkman émet l'idée que la grande majorité des cellules tumorales doivent initier une angiogénèse tumorale en produisant des substances diffusibles proangiogéniques ou TAFs (Tumor Angiogenic Factors ) pour former des tumeurs décelables (Folkman 1971; Folkman 1974). Il émet alors l'hypothèse qu'en bloquant l'action des substances pro-angiogéniques on peut stopper la croissance tumorale (Folkman *et al.*, 1987).

A l'état physiologique, il existe un équilibre naturel entre les agents pro et antiangiogéniques au cours de la vie adulte ainsi maintenant le réseau vasculaire dans un état de quiescence. Le « switch » angiogénique est alors en position « Off ». Au sein de la tumeur, cet équilibre est perpétuellement perturbé du fait de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. La rupture de cet équilibre initie l'angiogénèse, le « switch » est alors en position « On » (Bergers *et al.*, 2003). (figure 5)



**Figure 5 :** Concept de commutation « switch » angiogénique et normalisation de la vascularisation tumorale. (D'après Jain *et al.*, 2005)

### **1.3.2-Régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale**

L'angiogenèse tumorale aboutit à une architecture vasculaire immature et plastique (capillaires fenestrés sans ou avec peu de cellules murales) permettant une perfusion sanguine irrégulière, voir chaotique de la tumeur. Ceci a pour conséquence de créer un cercle vicieux d'angiogenèse en maintenant une hypoxie et une acidification de certaines zones. Celles-ci n'ont pas accès aux nutriments et à l'oxygène sécrètent par conséquent des facteurs pro-angiogéniques en continue (Hashizume *et al.*, 2000). (figure 6)

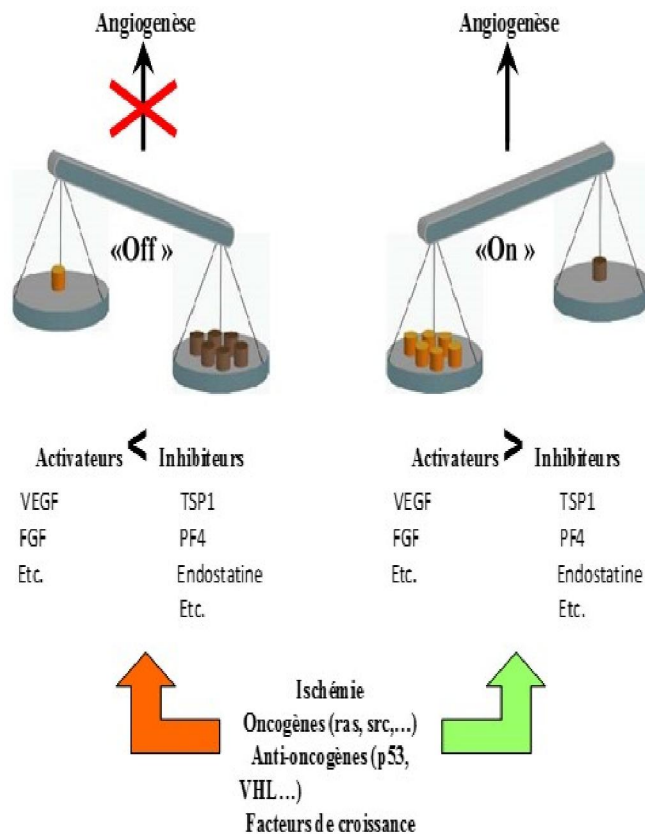
#### **•Les signaux environnementaux :**

L'activation d'oncogènes et/ou l'inactivation d'anti-oncogènes : l'oncogène Bcl2 qui est une protéine anti-apoptotique, transfectée dans des cellules tumorales induit une augmentation de l'expression du VEGF-A (Fernandez *et al.*, 2001). Le gène suppresseur de tumeur p53 influence indirectement la commutation angiogénique en augmentant en modulant les effets du facteur HIF-1 $\alpha$ , inhibant ainsi la transcription du VEGF-A (Zhang *et al.*, 2000). A ces modifications génétiques s'ajoute des stress métaboliques (hypoxie, hypoglycémie, acidification du milieu, etc.), des stress mécaniques, ou encore une réponse immune et inflammatoire (Carmeliet *et al.*, 2000).

#### **•Les facteurs angiogéniques :**

Si depuis longtemps les cellules tumorales ont été considérées comme les principales initiatrices du « switch » angiogénique via la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, d'autres types cellulaires tels que les cellules hématopoïétiques, les cellules endothéliales, les cellules murales, ou les protéines de la matrice extracellulaire y participent. Ces facteurs endogènes pro- et anti-angiogéniques sont de différentes natures : facteurs de croissance, cytokines, protéases, ou dérivés du clivage de la matrice extracellulaire.

Parmi les régulateurs clés de l'angiogenèse figurent le VEGF-A et ses récepteurs les FGFs et leurs récepteurs, les angiopoïétines / Tie2, les métalloprotéases et les activateurs du plasminogène. Des régulateurs négatifs endogènes comme la thrombospondine, l'angiostatine, l'endostatine, et le facteur plaquettaire-4 ont également été décrits. Certaines cytokines TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) et TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) ainsi que des métalloprotéinases matricielles, sont connues pour leurs rôles pro- et anti-angiogéniques (Carmeliet 2003). (figure 6)

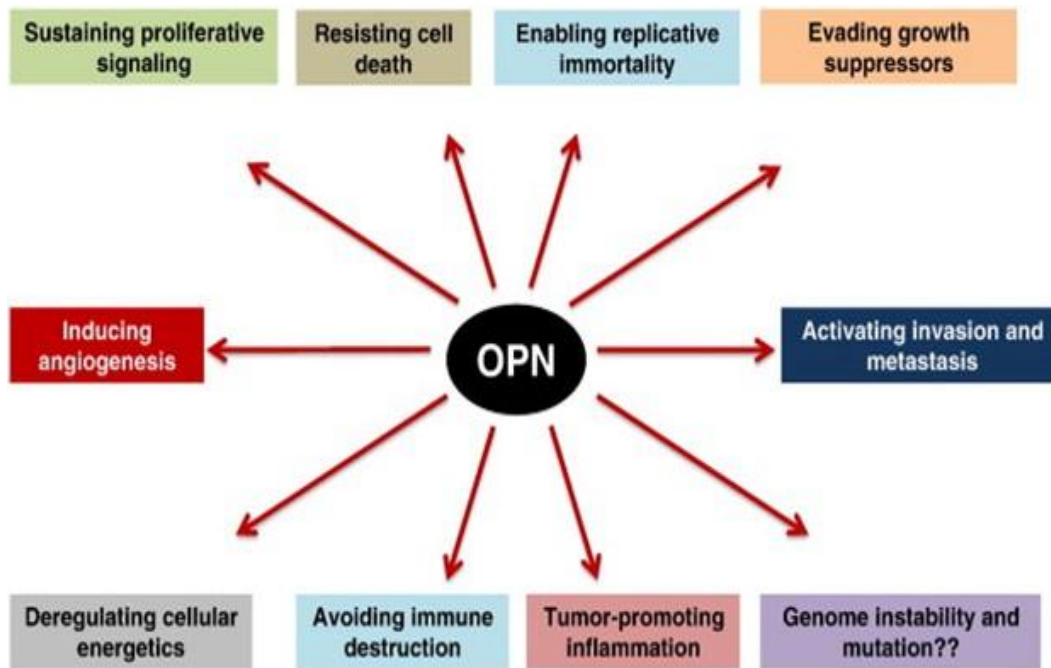


**Figure 6 : Régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale.** (D'après Bikfalvi, 2003)  
 Abréviations : TSP1 (thrombospondine 1) ; PF4 (facteur plaquettaire 4) ;  
 VHL (facteur Von Hippel Linau)

**•Ostéopontine (OPN) :**

Actuellement, les études sur l'OPN, connaissent un regain d'intérêt, surtout après la mise en évidence de sa localisation ectopique en dehors des tissus osseux. L'OPN joue un rôle dans l'angiogenèse et la tumorigenèse en inhibant l'apoptose des cellules endothéliales (Khan *et al.*, 2002), en leur conférant une cytoprotection via l'activation de la voie PI3K/AKT, ce qui induit l'augmentation de Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) et l'activation de la voie NF-κB (Nuclear Factor-kappa B). L'OPN augmente également l'expression du VEGF et l'activation du récepteur KDR (Kinase insert Domain containing Receptor) par la phosphorylation de AKT (protéine kinase B) et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase) (Dai *et al.*, 2009). (figure 7)





**Figure 7 : Implication de l'OPN dans la physiopathologie tumorale.**  
(D'après Shevde *et al.*, 2014)

## 2-VEGF-A et induction de l'angiogénèse

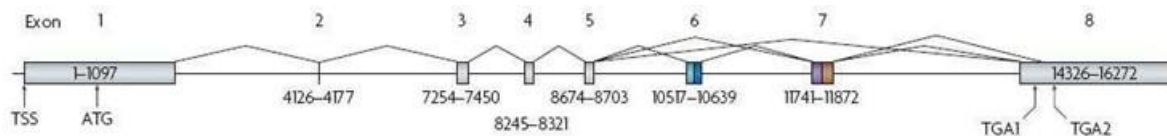
### 2.1- Le VEGF-A

Le VEGF a été initialement caractérisé comme un facteur capable d'accroître la perméabilité vasculaire (Senger *et al.*, 1983). Cette protéine associée à la formation d'œdèmes cérébraux dans les gliomes a été nommée vascular permeability factor (VPF). En 1989, Plouët et Ferrara rapportent indépendamment la purification d'un facteur mitogène pour les CEs qu'ils ont nommé respectivement vasculotropine (Plouët *et al.*, 1989) et vascular endothelial growth factor (Ferrara *et al.*, 1989). L'attribution des mêmes activités physiologiques ou pathologiques vis-à-vis de la croissance des vaisseaux a conduit à définir un seul et même facteur appelé VEGF (Leung *et al.*, 1989). Ce facteur est considéré comme le médiateur majeur des processus de vasculogénèse et d'angiogénèse lors de nombreuses conditions physiologiques ou pathologiques (Ferrara *et al.* 2003).

#### 2.1.1-Gène du VEGF-A

Chez l'Homme, le gène codant pour le VEGFA est situé sur la deuxième bande de la région 1 des bras courts du chromosome 6 (6p12), il mesure 16 272 paires de bases (pb) et se compose de 8 exons séparés par 7 introns (Harper *et al.*, 2008). (figure 8)

Sa transcription se fait dans un premier temps sous forme de pré-ARNm qui subit différents épissages alternatifs des exons 6 et 7 codants pour le domaine de liaison à l'héparine afin de donner 14 isoformes d'ARNm connues à ce jour codant chacune pour une isoforme protéique du VEGFA. La dénomination des isoformes du VEGF reflète le nombre d'acides aminés contenus dans la protéine. Les principales isoformes sont le VEGF<sub>121</sub>, le VEGF<sub>165</sub> et le VEGF<sub>189</sub> (Woolard *et al.*, 2009).



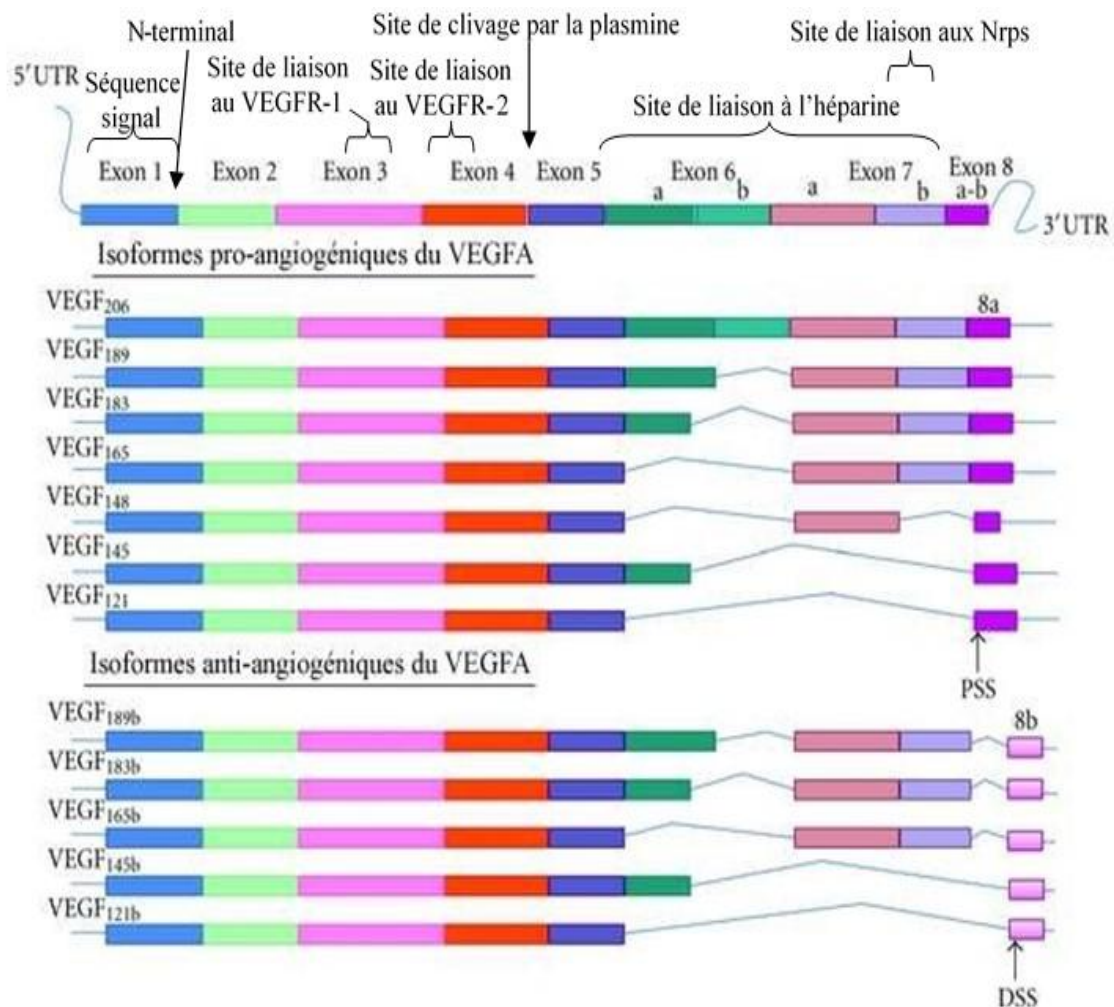
**Figure 8 : Structure du gène du VEGFA.** (D'après Harper *et al.*, 2008)

### **2.1.2-Structure protéique et isoformes**

Les monomères de VEGF-A sont associés par des ponts disulfures entre les résidus Cys51 d'une chaîne et Cys61 de l'autre. Un site potentiel de N-glycosylation au niveau du résidu Asn74 semble être nécessaire pour l'efficacité de la sécrétion des dimères de VEGF-A mais n'intervient pas dans leurs activités biologiques (Claffey *et al.*, 1995).

L'épissage alternatif des 8 exons composant le pré-ARNm du VEGFA permet de générer l'ensemble des 14 isoformes de ce dernier, découvertes à ce jour. Ce mécanisme permet la synthèse des isoformes majeures pro-angiogéniques du VEGFA (VEGFA<sub>165</sub>, VEGFA<sub>189</sub> et VEGFA<sub>121</sub>), mais aussi des isoformes mineures (VEGFA<sub>206</sub>, VEGFA<sub>183</sub>, VEGFA<sub>145</sub>, VEGFA<sub>148</sub> et VEGFA<sub>111</sub>) dont la fonction reste indéterminée, ainsi que d'isoformes anti-angiogéniques (VEGFA<sub>189b</sub>, VEGFA<sub>183b</sub>, VEGFA<sub>165b</sub>, VEGFA<sub>145b</sub> et VEGFA<sub>121b</sub>) (Hilmi *et al.*, 2012). (figure 9)

Certaines de ces isoformes peuvent être libérées de la matrice extracellulaire par protéolyse de leur partie C terminale. La partie biologiquement active du VEGFA correspondant aux 110 acides aminés terminaux, cela suggère que les isoformes courtes du VEGFA (VEGFA<sub>121</sub> et VEGFA<sub>165</sub>) seraient sécrétées tandis que les isoformes longues (VEGFA<sub>189</sub> et VEGFA<sub>206</sub>) seraient associées à la matrice extracellulaire.



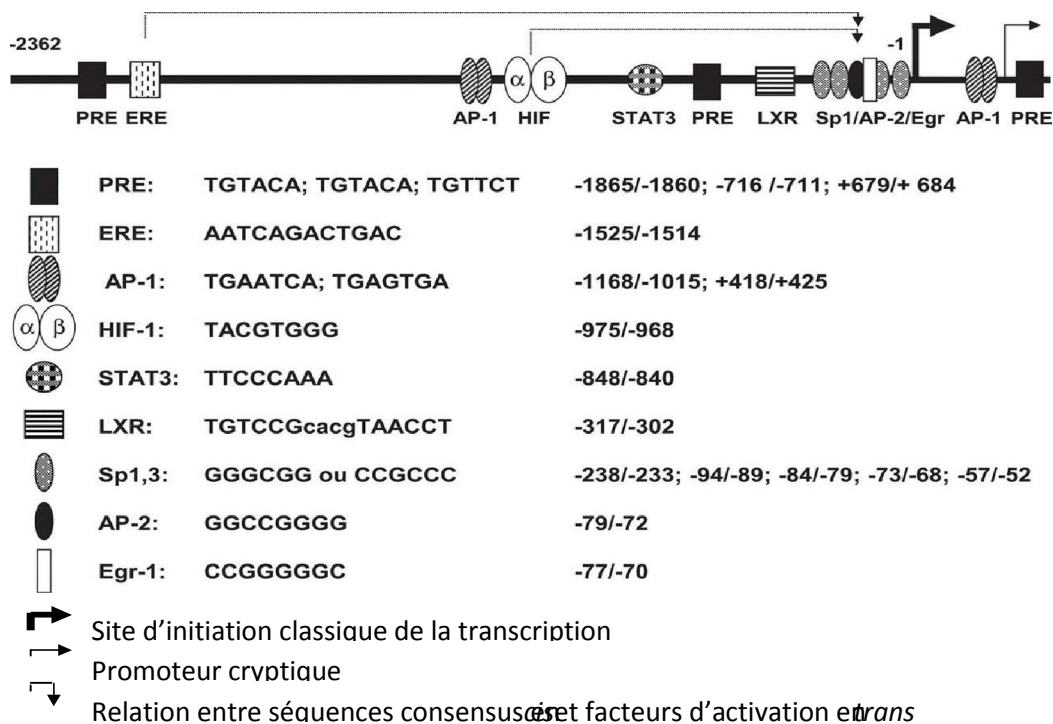
**Figure 9** : Les différentes isoformes de pré-ARNm du VEGFA. (D'après Hilmi *et al.*, 2012)

### 2.1.3-Régulation transcriptionnelle

De nombreuses études ont montré que la régulation de l'expression du VEGF-A est principalement transcriptionnelle mais elle se fait également par la stabilisation de ses ARNm. La région du promoteur du VEGF-A fait 2,4 kb chez l'Homme et ne contient pas de boîte « TATA » consensus servant à son activation (Chang *et al.*, 2004).

Le promoteur du VEGF-A est très conservé entre les espèces, il contient de nombreux sites consensus de fixation pour des facteurs de transcription comme : Sp1/Sp3(Specificity Protein), Ap-1, Ap-2(Activator Protein), Egr-1 (early gene response protein ), STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) et HIFs, ainsi que des sites de fixation des récepteurs d'hormones comme les œstrogènes (ERE), la progestérone (PRE) ou le récepteur X du foie (LRX) ( Pages *et al.*,2005). (figure 10)

Plusieurs paramètres de l'ischémie tumorale comme l'hypoxie ou la carence de glucose peuvent également induire la transcription du VEGF-A. De plus, le promoteur de ce gène peut être activé par de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase incluant ceux de l'EGF (Epidermal Growth Factor), de l'insuline ou des FGFs. Des dénominateurs communs entre tous ces signaux sont les voies de signalisation des Mitogen-Activated Protein-Kinases (MAP-Kinases) ainsi que de la Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt. Enfin de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur peuvent également moduler la transcription du VEGF-A (Pages *et al.*, 2005). (tableau 1)



**Figure 10: Le promoteur du VEGF-A : éléments de réponse et facteurs de transcription.**

(D'après Pages *et al.*, 2005)

**Tableau 1 : Les différents facteurs influençant la transcription du VEGF.**

(Pages *et al.*, 2005)

Facteurs de transcription	HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , Ap-1, Ap-2, Sp1, Sp3, STAT3, oestrogène, progestérone, NF- $\kappa$ B
Facteurs influençant les facteurs de transcription	Il-1 $\beta$ , Il-6, TGF $\alpha$ / $\beta$ , TNF $\alpha$ , EGF, AMPc, Ca <sup>2+</sup> , NO, Insuline/IGF, HGF, JNK, AMPK, p42/44, PKA, PKC, Akt, PI3K, sérum, ischémie, etc

## **2.1.4- Fonctions biologiques du VEGF-A**

### **• Activités biologiques**

► Le VEGF-A est connu sous le nom de VPF ou facteur de perméabilité vasculaire. Il accroît la perméabilité des micro-vaisseaux et induit l'extravasation de liquides et de protéines plasmatiques à partir de ces vaisseaux sanguins. Il induit également la vasodilatation de capillaires sanguins de manière dose-dépendante en provoquant la synthèse endothéliale de NO (Dvorak *et al.*, 1995).

► Le VEGF-A a la capacité d'activer la prolifération et la migration de cellules endothéliales dérivées d'artères, de veines et de vaisseaux lymphatiques *in vitro*, via l'activation des protéases telles que la collagénase interstitielle (MMP-1), l'u-PA et t-PA (activateur du plasminogène tissulaire) qui libèrent les cellules de leur ancrage et leur permettent ainsi de migrer (Unemori *et al.*, 1992).

► Le VEGF-A induit également une forte réponse angiogénique dans un large éventail de modèles *in vivo* (Plouet *et al.*, 1989). C'est aussi un inducteur de lymphangiogenèse, processus qui permet la synthèse des vaisseaux lymphatiques (Nagy *et al.*, 2002).

► Le VEGF-A agit *in vitro* et *in vivo* comme facteur de survie pour les cellules endothéliales. *In vitro*, il empêche la mort cellulaire par apoptose lors de la privation de sérum dans le milieu de culture (Gerber *et al.*, 1998). *In vivo*, on constate qu'une inhibition du VEGF-A entraîne d'importants changements apoptotiques chez la souris nouveau-né alors qu'elle n'a pas d'effet chez la souris adulte (Gerber *et al.*, 1999). Cette fonction protectrice du VEGF-A existe aussi pour les cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins nouvellement formés au sein d'une tumeur alors qu'elle disparaît dans des vaisseaux déjà établis (Benjamin *et al.*, 1999).

► Le VEGF-A possède un rôle d'interleukine et agit sur les cellules dérivées de la moelle osseuse : il induit la chémotaxie des monocytes et la formation de granulocytes et de macrophages. Les monocytes, les macrophages et certains lymphocytes T induisent le VEGF-A et contribuent ainsi à l'angiogenèse et à la maturation des vaisseaux néoformés lors des réactions inflammatoires. Le VEGF-A est également responsable d'une mobilisation rapide et accrue de cellules souches hématopoïétiques et stimule la production de lymphocytes B et de cellules myéloïdes immatures (Hattori *et al.*, 2001).

### • Fonctions physiologiques

Au niveau du développement embryonnaire, le VEGF-A joue un rôle crucial dans les processus de vasculogenèse et d'angiogenèse embryonnaires (Ferrara *et al.*, 1996). Il joue également un rôle important lors de la vie post-natale précoce et plus particulièrement dans le développement d'organes comme le cœur, le rein, le foie, la rétine (Ferrara 2004). Chez l'adulte le VEGF-A est essentiellement associé au phénomène d'angiogenèse ovarienne et de cicatrisation (Carmeliet 2003).

### • Fonctions pathologiques

Dans la majorité des tumeurs humaines, un accroissement de la quantité d'ARNm du VEGF-A est observé (Dvorak *et al.*, 1995). De même, la quantité de protéines du VEGF-A (sérique, plasmatique, urinaire ou mesurée dans les tumeurs) est globalement augmentée dans de nombreux types de cancers tels que les cancers gastriques ou mammaires (Yoshiji *et al.*, 1996), les ostéosarcomes (Kaya *et al.*, 2000) et les cancers des reins (Takahashi *et al.*, 1994).

De plus l'expression du VEGF-A est associée au développement de métastases (Rini 2005). L'ischémie se développant au sein des tumeurs est un des facteurs inducteurs de la vascularisation des tumeurs solides et plusieurs études ont montré que le VEGF-A est exprimé dans les régions tumorales hypoxiques et carencées en glucose (Satake *et al.*, 1998).

Le VEGF-A est également impliqué dans les processus d'inflammation et d'oedèmes cérébraux ainsi que dans les maladies cardio-vasculaires, oculaires, inflammatoires et les pathologies de l'appareil reproducteur féminin (Dvorak *et al.*, 1995; Carmeliet 2003).

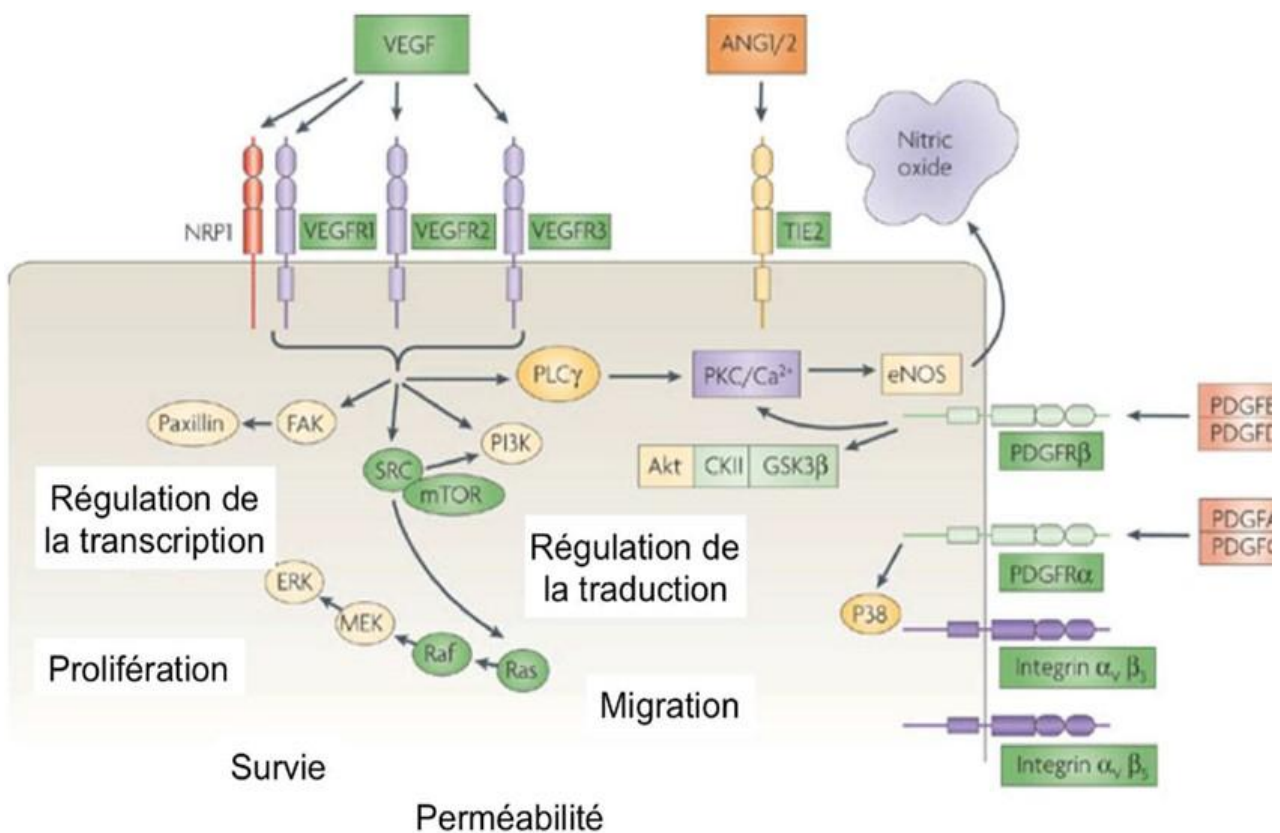
## **2.2- les récepteurs VEGF-A et signalisation**

Le VEGF-A est capable de se lier via deux domaines distincts (figure 11) et d'activer deux de ses récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) : le VEGFR1 et le VEGFR2. Ces RTK sont composés d'un domaine extracellulaire formé de sept domaines de type immunoglobuline, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire conservé comportant deux domaines d'activité enzymatique tyrosine kinase (Terman *et al.*, 1991).

La fixation d'un homo ou d'un hétérodimère de VEGFs entraîne successivement une dimérisation homologue ou hétérologue des RTK puis l'activation de leur activité tyrosine kinase intracellulaire. Ces RTK activés phosphorylent de manière croisée des résidus tyrosines de leur domaine intracellulaire qui vont servir de point d'ancrage à des protéines

possédant des domaines SH2 (ou domaine d'homologie avec Src). Après phosphorylation, ces protéines activent alors en cascade d'autres effecteurs cellulaires.

Le VEGFR-1 intervient dans la vasculogénèse et dans la régulation négative de la fixation du VEGF-A sur le VEGFR-2. Le VEGFR-2 induit les effets physiologiques et pathologiques majeurs du VEGF-A sur les cellules endothéliales en phosphorylant de nombreuses protéines cellulaires. Il contrôle, en effet, la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales ainsi que la perméabilité des vaisseaux sanguins (Cross *et al.*, 2003). (figure 11), (tableau 2)



**Figure 11 : Les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'angiogenèse.**(D'après Jain *et al.*, 2007)

### • Les autres VEGFs et leurs récepteurs

Les autres membres de la famille des VEGFs : VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, et VEGF-E, présentent des profils d'expression et des spécificités de fixation aux récepteurs (VEGFR-1 à 3) différents. Ils se distinguent également par leur fonction. Les VEGF-C et VEGF-D sont majoritairement des facteurs lymphangiogéniques et interviennent dans le développement du réseau vasculaire sanguin. Le VEGF-E identifié chez le parapoxvirus semble avoir la même activité que le VEGF-A. La fonction du VEGF-B est peu connue mais il pourrait contribuer à l'angiogenèse dans les tissus musculaires.

Le VEGFR-3 fixe les VEGF-C et VEGF-D mais pas le VEGF-A, il joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire et lymphatique dans l'embryon et dans la régulation de la formation des vaisseaux lymphatiques chez l'adulte (Jussila *et al.*, 2002). (figure 11)

En plus de ces récepteurs, les cellules endothéliales expriment la neuropiline-1 (NRP1) et la neuropiline-2 (NRP2), récepteurs cellulaires transmembranaires simples, qui agissent comme des co-récepteurs entre les VEGFs et leurs récepteurs (tableau 2).



**Tableau 2 : Les récepteurs des VEGFs**

<b>VEGFR-2</b> (KDR, flk-1)		<b>VEGFR-3</b> (Flt-4)	<b>Neuropiline</b>
VEGF-A VEGF-E VEGF-C et VEGF-D mature		VEGF-C VEGF-D Affinité variable suivant le niveau de maturation	NRP-1 : VEGF-A, VEGF-B, PlGF NRP-2 : VEGF-A, VEGF-C, PlGF
Toutes les CE Précurseurs hématopoïétiques et endothéliaux angioblastes		Réseau capillaire embryonnaire Endothélium lymphatique adulte Cellules hématopoïétiques Cellules endothéliales tumorales	NRP-1 : artères NRP-2 : veines et vaisseaux lymphatiques
Survie, migration, prolifération et perméabilisation des CE Vasculogénèse Angiogenèse tumorale et développementale - Lymphangiogenèse Hématopoïèse		Développement embryonnaire lymphatique et vasculaire Hématopoïèse Cicatrisation Angiogenèse tumorale Lymphangiogenèse tumorale Métastase	Répulsion axone Angiogenèse tumorale (NRP1/VEGFR-1) NRP-1 : augmente la fixation VEGF-A/VEGFR-2 NRP-2 : lymphangiogenèse
<i>Cross et al 2003</i> <i>Cleasson-Welsh 2003</i> <i>Jussila and Alitalo 2002</i>			

## **2.3- Angiogenèse et contrôle hypoxique du VEGF-A**

### **2.3.1-Hypoxie tissulaire**

En condition normale (normoxie), la quantité d'O<sub>2</sub> délivrée aux tissus est suffisante pour les besoins cellulaires. Ainsi, la pression en dioxygène (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub>) dans le sang artériel et dans les tissus est respectivement de 150 et 40 mmHg. Au contraire, en cas d'hypoxie, la quantité d'O<sub>2</sub> délivrée est insuffisante par rapport aux besoins cellulaires. En fait, les régions tissulaires sont considérées comme hypoxiques lorsque les valeurs de P<sub>i</sub>O<sub>2</sub> sont proches ou inférieures à 10 mm Hg. Ceci est ressenti dans l'ensemble des tissus et des cellules qui réagissent en activant un ensemble d'effecteurs spécifiques appelés facteurs induits par l'hypoxie (HIFs) (Faller *et al.*, 1999).

### **2.3.2-Le système HIF**

Les facteurs de transcription HIFs sont des hétérodimères formés d'une sous-unité nucléaire exprimée de manière constitutive et ubiquitaire, HIF-1 $\beta$ , et d'une sous-unité inductible  $\alpha$ . Il existe trois isoformes  $\alpha$  (a) : HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$ . HIF-1  $\alpha$  est le plus actif de la famille des HIFs.

#### **• Définition**

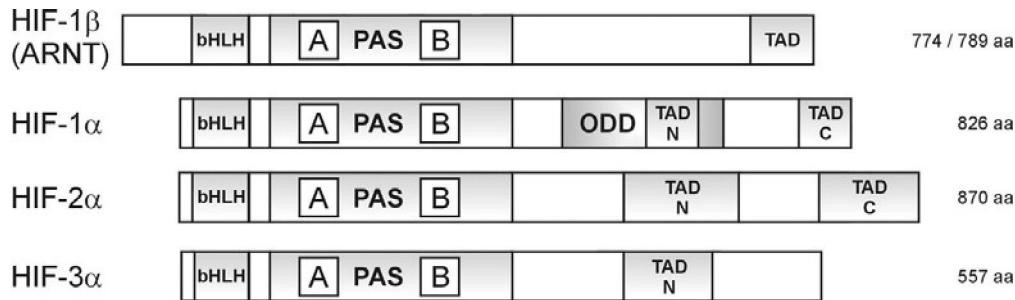
*HIF-1 $\alpha$*  ; Le facteur induit par l'hypoxie (ou Hypoxia Inducible Factor) et une protéine découverte en 1992 par Gregg Semenza qui étudiait l'érythropoïétine (EPO). En fait, c'est une séquence située en position 3' non-codante dans le promoteur de l'EPO, qui porte le nom d'élément réponse à l'hypoxie, hypoxia response element (HRE) et qui fixe la protéine HIF-1 en situation d'hypoxie (Semenza *et al.*, 1992). Par la suite, la séquence HRE a aussi été localisée sur plus de 70 autres gènes, tels le VEGF.

#### **• Structure**

HIF-1 est un hétérodimère obligatoire qui comprend une composante alpha de 826 acides aminés. On la retrouve constituée de 15 exons, sur le chromosome 14 (14q21-q24). De son côté, la composante bêta contient 789 acides aminés et est située sur le chromosome 1 (1q21). Ces deux unités font partie de la grande famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (basic-Helix Loop Helix / Per-ARNT-SIM). Le domaine HLH de la protéine agit sur la dimérisation des deux sous-unités alors que la partie basique intervient dans la fixation et la spécificité de la liaison de la protéine sur l'ADN. La composante bêta est aussi appelée ARNT1 (Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator) et est exprimée de façon

constitutive dans le noyau de la cellule pour la détoxification de celle-ci. Par contre, on retrouve HIF-1 $\alpha$  de façon stable, principalement en situation d'hypoxie. (figure 12)

HIF-1 $\alpha$  ne possède une demie-vie que de seulement 5 minutes dans le cytoplasme. Lors d'un retour aux conditions normales d'oxygène, les protéines HIF-1 $\alpha$  se trouvant dans le noyau seront dégradées par le protéasome nucléaire (Dery *et al.*, 2005).



**Figure 12 : Structure moléculaire des différentes sous unités HIFs.** (D'après Dery *et al.*, 2005). Abréviations : ODD (domaine de dégradation dépendant de l'oxygène) ; bHLH (domaine hélice boucle hélice basique) ; TAD-N et TAD-C (domaines de transactivation N- et C-terminaux) ; NLS (signal de localisation nucléaire) et PAS (PerARNT-Sim).

### ●Régulation

En présence d'oxygène (normoxie), HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée sur les résidus proline 402 et 564 par trois prolyl hydroxylases (PHD1 à PHD3). L'activité de ces enzymes est dépendante de l'oxygène (substrat), du fer (cofacteur) et du 2-oxoglutarate. L'hydroxylation (-OH) des résidus Proline ainsi que l'acétylation (AOc) du résidu Lysine 532 (Lys532) par l'acétyltransférase ARD1 permettent à la protéine von Hippel-Lindau (VHL), composant du complexe E3-ubiquitine ligase du protéasome, de reconnaître et d'ubiquitinyler HIF-1 $\alpha$ . Ce dernier est alors reconnu par la sous-unité 26S du protéasome et est dégradé.

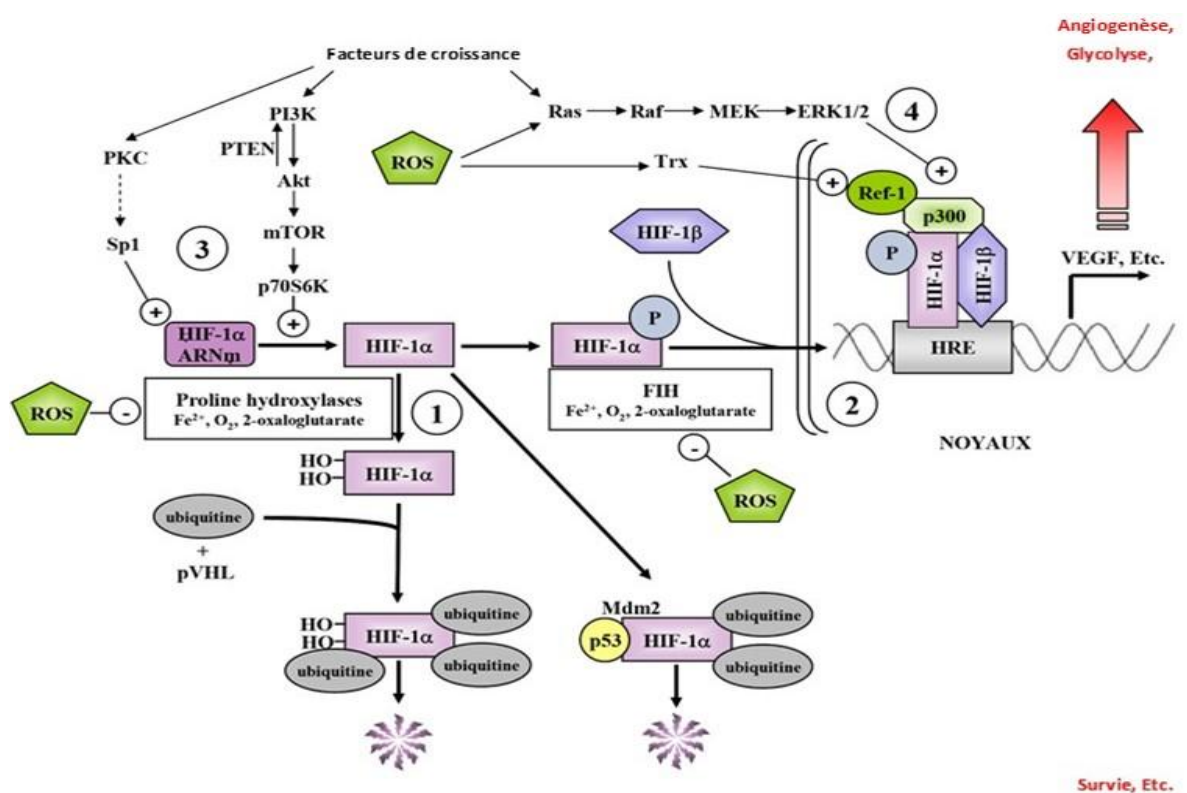
L'inactivation de la PHD-2 est suffisante à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . De plus, les PHD-2 et PHD-3 sont induites en hypoxie sous la dépendance de HIF, ce qui constitue un rétrocontrôle négatif de ce système (Gothié *et al.*, 2002 ; Berra *et al.* 2003).

En condition d'hypoxie, l'absence du substrat (O<sub>2</sub>) des prolyl hydroxylases inhibe leur capacité d'hydroxylation. La sous-unité HIF-1 $\alpha$  se stabilise et s'accumule dans le cytosol. Elle est ensuite transloquée vers le noyau où elle s'associe avec la sous-unité  $\beta$  de HIF-1. Le complexe HIF-1 $\alpha\beta$  se lie aux facteurs de transcription (tels que CBP/p300), et reconnaît les

séquences HRE présents sur les promoteurs des gènes cibles, augmentant ainsi leur transcription.

La stabilisation de HIF-1 est détectable pour des teneurs en oxygène inférieures à 5 % et allant jusqu'à l'anoxie. Dans ces conditions, l'activité des PHDs diminue en fonction de la concentration en oxygène. En dessous de 1,5 % d'oxygène, ces enzymes sont inhibées réversiblement par des radicaux libres oxygénés (ROS) de type  $H_2O_2$ , ce qui contribue au blocage efficace de leurs activités (Mansfield *et al.*, 2005).

La régulation du HIF-1 est principalement dépendante de l'oxygène, mais il existe d'autres voies influençant son activité. Elles sont toutes représentées dans la figure 13.



**Figure 13 :** Régulation de HIF-1. (D'après Powis *et al.*, 2004)

Il existe quatre mécanismes qui régulent l'activité de HIF-1 $\alpha$ . 1) Les proline hydroxylases hydroxylent le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène de HIF-1 $\alpha$ . 2) L'activité transactivatrice de HIF-1 est diminuée par hydroxylation d'un résidu asparagine par l'asparagine hydroxylase (FIH). 3) L'activation d'Akt et de mTOR par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) augmente la traduction de HIF-1 $\alpha$ . 4) La phosphorylation de p300/CBP par la voie de signalisation MAPK augmente la formation de complexes HIF-1/p300/CBP. L'hypoxie empêche les processus 1 et 2, stimule 3, et n'a aucun effet sur 4.

### **2.3.3-Interaction VEGF-A et HIF-1 $\alpha$**

Il est bien démontré que le phénomène d'hypoxie provoque une néovascularisation par l'intermédiaire de l'expression de facteurs angiogéniques. L'expression de l'ARN messager du VEGF est rapidement augmentée, de façon réversible, par de faibles pressions partielles d'oxygène dans des cultures cellulaires. De plus, cette expression est fortement stimulée dans les zones tumorales en hypoxie, proches de zones nécrotiques.

L'augmentation de l'expression du VEGF par l'hypoxie provient à la fois d'une activation de la transcription et d'une forte stabilisation de l'ARN messager du VEGF qui est habituellement labile (Dor *et al.*, 2001).

En hypoxie, une induction de l'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (via HIF-2 $\alpha$  principalement) ainsi que de celle de l'Ang-2, de la MMP-2 et de l'uPAR (Récepteur de l'activateur de l'u-PA) est également observée (Elvert *et al.*, 2003). De plus, l'adénosine libérée par les cellules hypoxiques en se liant aux récepteurs A2 stimule la voie dépendante de la PKA qui active la production de VEGF-A (Takagi *et al.*, 1996).

## **3-Modulation thérapeutique de l'angiogenèse**

### **3.1- Les modèles d'étude**

Le développement de molécules inhibitrices de l'angiogenèse tumorale nécessite l'utilisation de tests précliniques (*in vitro* et *in vivo*). Les tests *in vitro* constituent une première étape, évaluant l'impact d'une molécule donnée sur la croissance, la prolifération des cellules endothéliales, leur capacité à migrer et la formation de tubes capillaires. Les études *in vivo* sont nécessaires pour confirmer ces résultats. Idéalement, les tests doivent être faciles à réaliser, reproductibles, quantitatifs, peu coûteux et permettre une analyse rapide

#### **3.1.1-Modèles *In vitro***

Chacune des étapes de l'angiogenèse peut être recréée *in vitro* pour le screening de nouvelles molécules. Des cellules endothéliales sont le plus souvent utilisées, du fait du rôle central qu'elles occupent lors du processus angiogénique.

#### **•Choix des cellules endothéliales**

D'après la littérature, de nombreux types de cellules endothéliales sont utilisés, parmi lesquelles les plus couramment citées sont les HUVECs, dont la source (le cordon ombilical) est d'accès facile. Pour des raisons similaires, l'utilisation de cellules endothéliales d'aorte

bovine (BAE) ou murine (MAE) est également souvent décrite. Cependant, ces cellules proviennent de larges vaisseaux, et présentent donc des caractéristiques phénotypiques différentes de celles des capillaires sanguins, principaux acteurs de l'angiogenèse. Les sources les plus courantes de cellules endothéliales microvasculaires sont la peau, le cerveau, le tissu adipeux et la glande surrénale.

#### **•Les tests de migration des cellules endothéliales**

La mobilité cellulaire a un intérêt particulier car la migration cellulaire est nécessaire à la fois pour l'invasion tumorale et l'angiogenèse tumorale. 2 principaux essais permettent la mesure de la motilité cellulaire en réponse aux facteurs.

-Dans **le test de blessure**, appelé aussi test ou **decicatrice** (Wound-healing assay), les cellules endothéliales sont cultivées jusqu'à confluence et une blessure est réalisée au milieu de la monocouche. Le remplissage de l'espace par les cellules endothéliales est initié par la migration. Sa quantification implique la mesure de la distance parcourue par les cellules endothéliales, la zone recouverte par les cellules endothéliales, ou le temps nécessaire pour fermer la zone de la blessure (Staton *et al.*, 2004).

-**L'essai "transwell"** est connu sous le nom de l'essai de la chambre Boyden. Les cellules endothéliales sont cultivées sur un côté d'une membrane poreuse, et une solution contenant le facteur potentiel migratoire est placé sur le côté opposé de la membrane. Après un période d'incubation de 3 à 18 h, les cellules ayant migré sont colorées et comptées (Goodwin 2007).

#### **•Les tests de prolifération des cellules endothéliales**

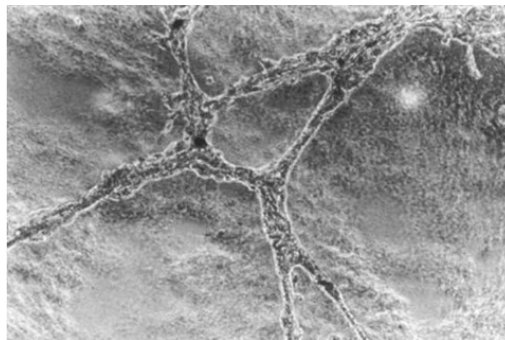
Cette migration des cellules est accompagnée de leur prolifération. Les effets des facteurs angiogéniques sur la prolifération peuvent être évalués par le comptage direct des cellules, la quantification de la synthèse de l'ADN ou l'évaluation de l'activité métabolique.

Les tests les plus simples consistent à compter les cellules viables avec un **hémocytomètre** et un colorant vital (e.g. bleu de trypan), ou un compteur électronique type **Coulter**. Il est également possible d'utiliser un test de prolifération type **MTT**, dans lequel un sel de tétrazolium (jaune) est clivé par les enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénases) en cristaux de formazan (bleus). Par ailleurs, la synthèse d'ADN peut aussi être utilisée comme indice de prolifération en évaluant par exemple l'incorporation de **thymidine tritiée**. D'autres méthodes permettent d'étudier la répartition dans le cycle

cellulaire, en utilisant des molécules s'incorporant dans l'ADN, comme le 5-bromodéoxyuridine (*BrdU*) (Staton *et al.*, 2004).

#### **•Les tests de différenciation (formation de tubes capillaires)**

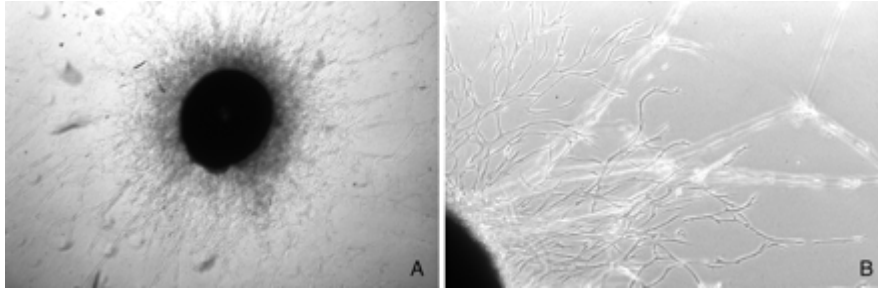
Les dernières étapes de l'angiogenèse impliquent la morphogenèse capillaire. La différenciation des cellules endothéliales pour former des vaisseaux peut être induite *in vitro* en cultivant les cellules endothéliales en présence de différents composants de la MEC, par exemple des gels bi- ou tri-dimensionnels de collagène I ou de fibrine, ou du Matrigel®. Les cellules endothéliales cultivées sur **Matrigel®** peuvent former des structures capillaires en à peine 6 heures, ce qui rend ce test adapté au screening de molécules anti-angiogéniques. La réponse est quantifiée par des techniques d'analyses d'images, permettant notamment de mesurer le nombre et la longueur des tubes ou l'aire couverte par le réseau de capillaires (Benelliet *al.*, 1998). (figure 14)



**Figure 14** : Formation de tubes sur Matrigel®. (D'Après Auerbach *et al.*, 2003)

#### **•L'anneau aortique**

L'angiogenèse n'implique pas uniquement les cellules endothéliales, ce qui a conduit à l'utilisation de tests plus sophistiqués que ceux décrits précédemment, sur organes *ex vivo*, tels que le test de l'anneau aortique. Dans ce test, une aorte de rat est isolée et coupée en segments qui sont placés en culture, dans une matrice (collagène I, fibrine ou Matrigel®). Après 7-14j, une quantification est faite en mesurant le nombre et la longueur des vaisseaux, par analyse d'image en microscopie. Contrairement à la plupart des autres modèles *in vitro*, celui-ci implique également des cellules non-endothéliales (CML, péricytes et fibroblastes) (Taraboletti *et al.*, 2004). (figure 15)



**Figure 15 :** Croissance de vaisseaux à partir d'une aorte. A. Vue d'ensemble. B. Vue de détail montrant la formation de tubes par les cellules endothéliales. (D'Après Auerbach *et al.*, 2003)

### **3.1.2-Les modèles *in vivo***

Le test *in vivo* idéal devrait permettre de suivre la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux dans un environnement naturel, et de se prêter à une analyse rapide, aisée, et si possible quantitative et en temps réel. Les principaux modèles d'angiogenèse *in vivo* sont présentés ci-après.

#### **•La membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet (CAM Assay)**

Utilisé à l'origine par les embryologistes, le test CAM (chorioallantoic membrane) a été utilisé par la suite pour le screening de molécules anti-angiogéniques, du fait de sa simplicité et de son faible coût. Il a permis l'identification de la plupart des facteurs angiogéniques connus à ce jour. Dans ce test, des œufs fertilisés sont incubés à 37°C pendant 72 heures. Une fenêtre rectangulaire est alors découpée dans la coquille afin d'exposer les vaisseaux de la CAM. Le stimulus pro-angiogénique (molécule pro-angiogénique ou fragment tumoral) est ajouté, en présence ou en l'absence des molécules anti-angiogéniques à tester. La réponse angiogénique est quantifiée 3 à 4 jours plus tard. En présence de molécules anti-angiogéniques, les vaisseaux deviennent moins denses (Ribatti *et al.*, 1999). (figure 16)



**Figure 16 :** vue d'ensemble de la CAM d'œuf fertilisé. (D'après Vargas *et al.*, 2007)



### **•L'angiogenèse cornéenne**

La cornée est normalement avasculaire, donc tout vaisseau apparaissant dans la cornée après stimulation correspond à des vaisseaux nouvellement formés, ce qui fait de ce test un modèle idéal d'angiogenèse *in vivo*. Brièvement, une poche est formée dans la cornée de lapins, de rats ou de souris, dans laquelle est introduit le stimulus angiogénique (e.g. fragment tumoral). De nouveaux vaisseaux sont formés à partir des vaisseaux limbiques périphériques. Les molécules anti-angiogéniques peuvent être administrées par voie orale, systémique, ou en implantant des pompes osmotiques, qui vont progressivement libérer la substance. L'observation de la réponse vasculaire peut se faire directement pendant toute la durée de l'expérience, avec ou sans l'utilisation d'agents de contraste, tels que le dextran marqué avec un fluorochrome tel que la fluorescéine isothiocyanate (Holzer *et al.*, 2004).

### **•Les implants sous-cutanés**

Des cellules tumorales sont introduites dans une matrice polymère, qui est ensuite implantée en sous-cutané chez l'animal. Les cellules tumorales ne sont pas en contact direct avec l'environnement de l'hôte, mais les facteurs pro-angiogéniques qu'elles produisent peuvent diffuser en dehors de la matrice. Après injection des composés à tester, les vaisseaux sanguins formés peuvent être quantifiés dès 3 jours après induction de l'angiogenèse, en mesurant le taux d'hémoglobine, par analyse histologique ou en estimant le flux sanguin à l'aide de traceurs radioactifs ou fluorescents (Taraboletti *et al.*, 2004).

## **3.2-Thérapie anti-angiogénique**

Le professeur Folkman a formulé au début des années 70 une hypothèse qui a conduit au développement de la thérapie anti-angiogénique : « les vaisseaux sanguins permettent le développement de la tumeur en lui apportant toute la nourriture dont elle a besoin. Si on bloque cette vascularisation, on la fait mourir de faim » et énonça pour la première fois le concept des molécules anti-angiogéniques. La preuve du concept de ce type de thérapie a été donnée par le premier médicament mis sur le marché : un inhibiteur de l'agent pro-angiogénique VEGF. Depuis, d'autres stratégies ont été développées.

### **3.2.1-Le concept des –INIB et des –UMAB**

Deux grands types d'inhibiteurs ont vu le jour ces dernières années ; les INIB (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase) et les UMAB (Human monoclonal antibodies). Les INIB sont de petits inhibiteurs pharmacologiques qui passent la membrane plasmique très

facilement. Les UMAB sont des anticorps monoclonaux, humanisés, qui ciblent le développement tumoral. Les INIB sont des inhibiteurs mimétiques de l'ATP qui bloquent des enzymes à activité kinase. Ces dernières sont de deux types ; soit des récepteurs à activité kinase soit des kinases intracellulaire.

### **3.2.2-La stratégie anti-VEGF**

Le premier médicament utilisé en clinique est le *bévacizumab Avastin® (BVZ)*, anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé vers le ligand VEGF-A en vue de neutraliser ses effets sur les différents récepteurs qu'il active. Approuvé dès 2004 par la FDA (Food Drug Administration) pour le traitement du cancer colorectal métastatique en association avec la chimiothérapie. les données cliniques indiquent que l'association BVZ+IFL (une association Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin) augmente la survie sans progression de 4 mois et la survie globale de 5 mois par rapport au traitement IFL seul (Hurwitz *et al.*, 2004). Son utilisation a rapidement été étendue à d'autres types cancers métastatiques. dans le cancer du poumon (Sandler *et al.*, 2006), le cancer du rein (Escudier *et al.*, 2007), le glioblastome (Friedman *et al.*, 2009) et le cancer ovarien (Burger *et al.*, 2011).

En général, le BVZ n'est pas efficace en monothérapie. En association avec une chimiothérapie, il augmente de façon significative la survie sans progression. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une normalisation vasculaire par les anti-VEGFs. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF normalise les vaisseaux sanguins ce qui facilite l'administration de la chimiothérapie au sein de la tumeur et augmente son efficacité (Jain, 2005).

Récemment, un autre moyen de piéger le VEGF circulant (VEGF-Trap) a été proposé à la clinique. Il s'agit de *l'aflibercept Zaltrap®*, une protéine de fusion soluble contenant les domaines extracellulaires du VEGFR-1 et du VEGFR-2 et capable de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF. approuvé par la FDA en association avec une chimiothérapie, en 2ème ligne dans le traitement du cancer colorectal. Approuvé par la FDA, en association avec une chimiothérapie, en 2ème ligne dans le traitement du cancer colorectal. Cette approbation se base sur une étude clinique de phase III qui a montré une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale des patients traités avec l'aflibercept en combinaison avec la chimiothérapie (Van Cutsem *et al.*, 2012).

### 3.2.2-La stratégie anti-récepteur du VEGF

Un autre moyen de bloquer l'angiogenèse tumorale est de cibler directement le domaine kinase des récepteurs impliqués dans la régulation de ce processus. Ces inhibiteurs sont de petites molécules mimétiques de l'ATP. Elles diffusent librement à l'intérieur des cellules et entrent en compétition avec l'ATP pour la fixation au domaine intracellulaire des récepteurs. Cette compétition inhibe l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs cibles.

Un grand nombre d'anti-angiogéniques de ce type sont actuellement utilisés en clinique ou en cours de caractérisation dans des études précliniques et cliniques. Les plus utilisés en clinique sont le *sunitinib* et le *sorafenib*. Ces deux inhibiteurs ciblent les récepteurs du VEGF, les récepteurs du PDGF et les récepteurs CSF-1R (Colony stimulating factor 1 Receptor) et FLT-3 (fms-related tyrosine kinase 3) (Raymond *et al.*, 2011).

Une autre approche s'appuie sur *le ramucizumab* est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur VEGF-R2, testé en phase clinique III dans le traitement du cancer du sein, et de l'adénocarcinome gastrique.

### 3.2.3-Stratégie anti- signalisation

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) contrôle la croissance cellulaire en modulant le métabolisme, la synthèse protéique et l'autophagie. La protéine mTOR, joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale en régulant l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de la régulation de la traduction du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  qui induit l'expression du VEGF et l'angiogenèse tumorale. L'activité clinique anti-tumorale des inhibiteurs de mTOR est donc expliquée par une inhibition de l'angiogenèse (Thomas *et al.*, 2006).

Récemment, L'inhibition de l'OPN est l'une des approches antiangiogéniques et anti tumorale la mieux adaptée en clinique (Yang *et al.*, 2012). Via une action directe, un anticorps bispécifique de VEGF et de l'OPN est capable d'inhiber la croissance tumorale et les métastases dans les poumons (Kou *et al.*,2010). Via une action indirecte, assurée par certains éléments alimentation tel que le curcuma qui inhibe le facteur de transcription NF-kB responsable de l'induction en amont de ces molécules (Lv *et al.*,2013).

## **4- Homocystéine**

### **4.1-Métabolisme cellulaire de l'homocystéine**

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. L'Hcy n'est pas codée génétiquement et est absente des protéines. Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le catabolisme d'Hcy se produit principalement dans le foie et dans les reins par deux voies : la voie de la reméthylation et la voie de la transulfuration. (figure 17)

#### **4.1.1-Les voies de la reméthylation**

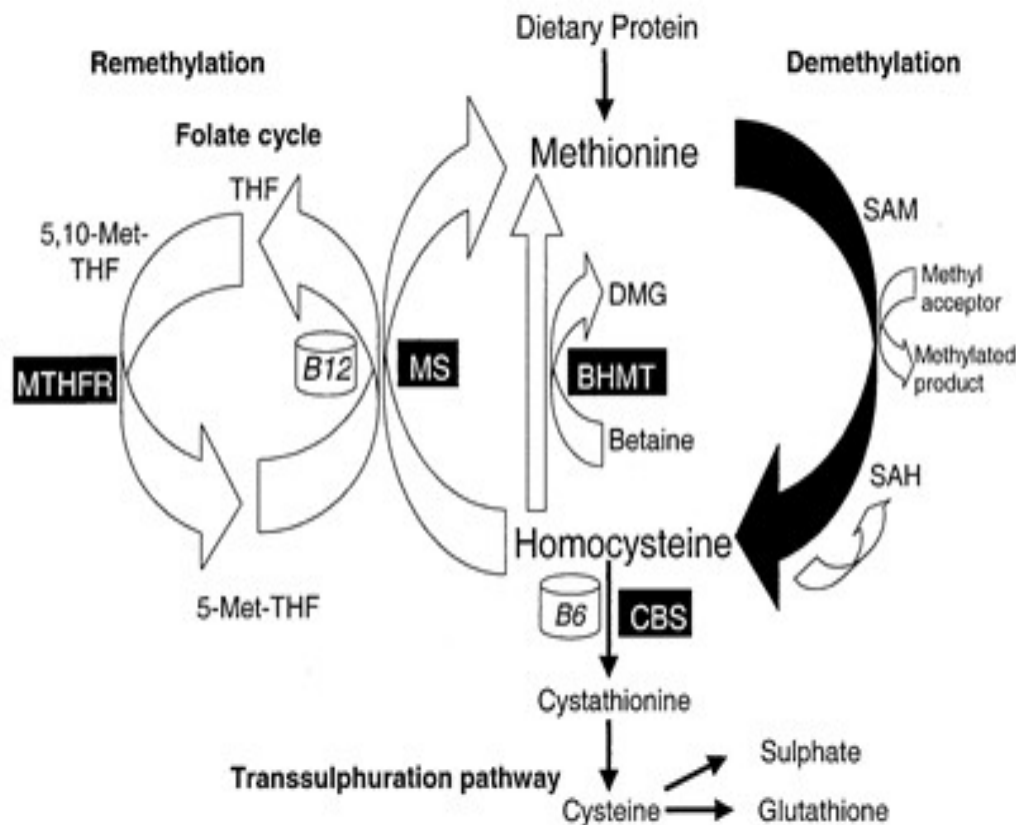
Elles assurent la reméthylation de l'Hcy en méthionine selon deux réactions enzymatiques distinctes. La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5-MéthylTétraHydroFolate (5MTHF), donneuse de groupement méthyl. Sa formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHFR (5,10-MéthylèneTétraHydroFolate Réductase), et la Méthionine Synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12. Ce transfert du groupe méthyl, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B<sub>9</sub> et la vitamine B<sub>12</sub>.

La deuxième réaction se déroule en grande partie au niveau du foie. Elle est de faible activité, et fait intervenir une enzyme hépatique, la bêtaïne-homocystéine méthyltransférase. La bêtaïne est la molécule donneuse de groupement méthyl. L'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie en fonction du tissu considéré et du statut protéique. En cas d'apport protéique excessif la voie de la transulfuration est favorisée, à l'inverse en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine (Selhub1999, Stipanuk 2004).

#### **4.1.2- La voie de la transulfuration**

La majorité d' Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transulfuration. Cette voie permet à la méthionine, d'apporter un atome de soufre pour la formation de cystéine. L'activation de la méthionine en S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM) se fait sous l'influence de la Méthionine-Adénosyl-Transférase (MAT). La SAM, principal donneur de groupement méthyl de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-Adénosine-L-Homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase. Sous l'influence de la Cystathionine-β-Synthase (CBS), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle-même clivée et désaminée en cystéine et en α-céto butyrate

(par la Cystéine  $\gamma$  Lyase [CGL]). Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6 (Selhubet *al.*, 1999 ; Stipanuk *et al.*, 2004).



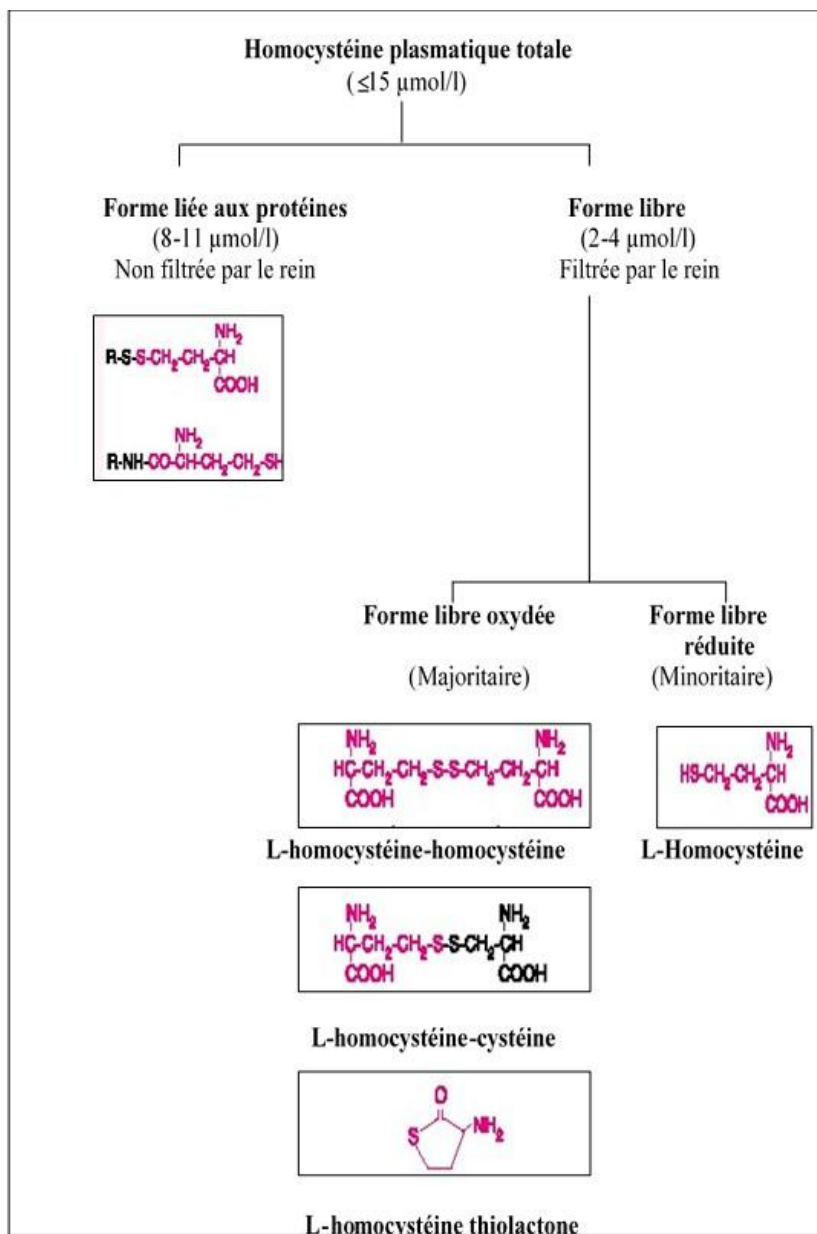
**Figure 17 :** Métabolisme de l'homocystéine (D'après Lawrence de Koning *et al.*, 2003)

#### 4.2- Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes

Il est important de comprendre le terme « homocystéine totale » (t-Hcy) dans un sens biochimique, parce que ceci aura pertinence dans les discussions qui suivent sur la méthodologie et sur les mécanismes physiopathologiques. Le plasma humain contient des quantités réduites et oxydées d'homocystéine (McCully *et al.*, 1975). Des définitions chimiques ont été établies par Butz et Du Vigneaud en 1932 (Selhubet *al.*, 1999). Le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine et le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle homocystine. Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés. Les formes

oxydées d'homocystéine comportent habituellement 98–99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80–90% sont liées aux protéines (McCully *et al.*, 1975). (figure 18)

L'homocystéine totale est donc la somme de toutes les formes d'homocystéine qui existent dans le plasma ou sérum. Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma « des adultes en bonne santé » est 5–15  $\mu\text{mol/L}$  (tableau 3) (Robinson *et al.*, 1995). Cependant, Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques (tableau 4).



**Tableau 3: Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine chez l'homme.**  
(D'après Ueland *et al.*, 1993)

	Homocystéine $\mu\text{mol/L}$
Normal	5 – 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 25
Intermédiaire	26 – 50
Sévère	> 50

**Tableau 4: Causes d'hyperhomocystéinémie chez l'homme .**

(D'après Andersson *et al.*, 1992, Scott *et al.*, 1998, Brattstrom *et al.*, 1998)

Causes	Hyperhomocystéinémies	
	Intermédiaire et modérée (16 – 50 $\mu\text{mol/L}$ )	Sévère (> 50 $\mu\text{mol/L}$ )
Génétiques	Déficit hétérozygote en CBS Polymorphisme <i>MTHFR C677T</i>	Déficit homozygote en CBS Déficit homozygote en MTHFR Déficit en méthionine synthase
Nutritionnelles	Déficit en folates Déficit en Vitamine B6 Déficit en Vitamine B12	
Thérapeutiques	Anticonvulsivantes Méthotrexate Phénytoïne Monoxyde d'azote Azaribine	
Etats pathologiques	Insuffisance rénale chronique Hypothyroïdie Psoriasis Arthritie rhumatoïde Diabète type II Cancers (pancréas, sein, ovaire)	

### **4.3- Effet de l'homocystéine sur l'endothélium**

#### **4.3.1-Stress oxydatif**

L'homocystéine possède *in vitro* une action pro-oxydante, son groupe thiol étant oxydé pour former des espèces réactives de l'oxygène (anions superoxydes O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et de radicaux hydroxyl OH<sup>·</sup>). Ces radicaux favoriseraient la discontinuité des cellules endothéliales *in vitro* qui est traduit par des lésions et de dysfonctionnement cellulaires (Loscalzo *et al.*,1996). L'homocystéine peut également sensibiliser les cellules au stress oxydatif en diminuant l'expression d'une large gamme d'enzymes anti-oxydantes ; superoxyde dismutase (SOD) et glutathion peroxydase (GPX) sont les plus affectées. Des résultats indiquent notamment que l'expression et l'activité de l'hème oxygénase-1 et de la glutathion peroxidase étaient diminuées lors de cultures de cellules endothéliales après traitement par de l'homocystéine (Outinen *et al.*,1999 ; Upchurch *et al.*,1997).

Des travaux suggèrent que le stress oxydant induit par l'Hcy est dû à l'effet « biochimique » qu'à son effet « chimique ». Le stress oxydant n'est induit que dans l'endothélium incubé avec de L-homocystéine naturelle, mais pas avec la D-homocystéine (Heydrick *et al.* 2004). L'effet pro-oxydant de la L-homocystéine peut être expliqué par un mécanisme appelé « eNOS uncoupling » (Pritchard *et al.*,1995 ; Zhao *et al.*,2003).

Brièvement, la L-homocystéine fait que eNOS devient la source majeur de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). L'O<sub>2</sub><sup>-</sup> inactive rapidement NO, conduisant à la formation de fortes concentrations de peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), un oxydant très puissant et toxique.

#### **4.3.2- L'apoptose**

Zhang *et al.*,(2001) ont démontré que l'homocystéine induit la mort cellulaire par apoptose des cellules endothéliales humaines en culture par l'activation de l'UPR (Unfolded Protein Response). La voie de signalisation de l'UPR est régulée par une protéine kinase transmembranaire de type-I ER (IRE-1) et des agents d'induction du stress duréticulum endoplasmique (RE). L'IRE-1 est responsable de la transduction du signal d'accumulation de UPR. L'activation de IRE-1 induite par l'Hcy provoque une activation rapide et soutenue des JNK-kinases (c-Jun N-terminal kinase), (Cai *et al.*, 2000 ; Urano *et al.*, 2000). Puisque l'activation persistante de JNK-kinases est associée à la mort par apoptose (Chen *et al.*, 1996), il est possible que l'Hcy induise la mort cellulaire par un mécanisme UPR-dépendant.



En outre, l'activation de la caspase 3 est essentielle pour l'apoptose induite par l'Hcy. Elle est impliquée dans l'apoptose des cellules HL-60 (Huang *et al.*, 2001), des cellules endothéliales (Tyagi *et al.*, 2006) et des cellules stromales humaines (Kim *et al.*, 2006).

#### **4.3.3-Hypométhylation**

La méthylation de l'ADN est un processus dans lequel une des quatre bases azotées nucléotidiques peut être modifiée par l'addition d'un groupement méthyle. Chez les vertébrés, la méthylation porte le plus souvent sur la cytosine qui est méthylée en 5-CH<sub>3</sub>-cytosine (2 à 7 % de la quantité totale de la base) dans les séquences CpG de l'ADN. Elle joue un rôle prépondérant dans l'expression des gènes et sert en réprimant l'expression de certains gènes (Gokul *et al.*,2013), à établir et à maintenir les profils d'expression génique spécifiques à chaque tissu (Song *et al.*, 2005). L'homocystéine influence le niveau de méthylation de l'ADN car :

- ▶ La reméthylation de l'homocystéine produit de la méthionine, le précurseur de la S-adénosylméthionine (SAM), qui est un donneur de groupes méthyles impliqués dans plus de cent réactions de méthylations dans notre organisme ;
- ▶ SAH, est un puissant inhibiteur des enzymes responsables de la méthylation de l'ADN, les méthyltransférases ; l'inhibition de ces dernières par une hyperhomocystéinémie est donc responsable d'un état d'hypométhylation dans la cellule (Lieber2002).

Cependant dans la littérature actuelle le lien entre l'HH et hypométhylation n'est pas toujours établie ; la méthylation globale d'ADN a été mesurée dans des leucocytes et des lymphocytes périphériques de patients atteints de maladies vasculaires. l'ADN leucocytaire a été hypométhylé (Castro *et al.*,2003), alors que celui des lymphocytes, a été hyperméthylé (Sharma *et al.*, 2008).

Chez les animaux, l'examen de la corrélation entre le rapport SAM :SAH (potentiel de méthylation) et l'HH affichait des résultats opposés ; corrélation positive et induction de l'hypométhylation dans l'aorte (Jiang *et al.*,2012), face à une corrélation négative dans le cerveau et le foie (Devlin *et al.*,2007).

De même, les essais thérapeutiques visant à corriger l'hypométhylation de l'ADN en réduisant les taux d'Hcy étaient contradictoires ; le statut de méthylation a été restauré dans certains (Sie *et al.*,2013) et pas de changement dans d'autres (Min 2009 ; Kalani,*et al.*,2014) .

#### **4.4- Homocystéine et angiogénèse : Etat de connaissance.**

Le lien entre l'Hcy et le processus angiogénique a été évoqué pour la première fois par Wang *et al.*, (1997) qui ont rapporté que l'Hcy inhibe la prolifération des CE. En s'inspirant de ces travaux, l'équipe de Nagai en (2001) a étudié l'effet de l'Hcy sur les étapes clés de l'angiogénèse: la prolifération, la migration des CE et la morphogénèse. Les résultats obtenus ont révélé le pouvoir antiangiogénique de l'Hcy. Par la suite, les chercheurs se sont intéressés à examiner cet effet sur des modèles de cellules tumorales (Chavarria *et al.*,2003a). l'Hcy semblait être un puissant inhibiteur de la prolifération et de l'invasion tumorale en altérant l'activité des MMP(2 et 9) (Chavarria *et al.*,2003b). Ces études et d'autres ont annoncé l'idée du potentiel pharmacologique de l'Hcy.

Et depuis, Plusieurs hypothèses ont été développées afin d'expliquer les mécanismes propres d'une telle action; certaines décrivent une action directe par apoptose de la CE résultante d'un stress oxydant (Bao *et al.*,2009), ou encore un état d'hypométhylation (Tan *et al.*,2006) induits par l'Hcy. Tandis que d'autres déterminent une action indirecte par inhibition des médiateurs de la prolifération et de la motilité de la CE principalement le VEGF-A et son récepteur (Latacha. *et al.*,2005 ; Atta *et al.*,2008).

Actuellement, le rôle de l'Hcy dans la modulation de l'expression du VEGF-A est fortement discuté surtout après la découverte d'une corrélation négative entre l'Hcy et le facteur transcriptionnel du VEGF-A: HIF-1 $\alpha$  (Veeranki *et al.*,2014).

## *Chapitre 2 : Matériels & Méthodes*

Les expérimentations entretenues pour ce thème sont réparties en deux grandes parties, une étude *in vivo* et une autre *in vitro*.

## **1-L'étude *in vivo***

Elle a comme objectifs d'induire un état d'Hyperhomocystéinémie et d'évaluer par la suite son impact sur le profil biochimique (MDA, Protéine totale et CRP), sur la composante hématologique et histologique (aorte, foie et thymus) et finalement sur l'expression tissulaire et génique de certains facteurs pro-angiogéniques (VEGF- A, HIF-1 $\alpha$ ).

### **1.1-Matériel biologique**

#### **1.1.1-Choix et entretien du modèle animal :**

L'étude est réalisée sur des rats males de souche albinos Wistar procurés de l'Institut Pasteur d'Alger (Algérie) et âgés de 8 semaines. Une fois reçus, les animaux sont soumis à une période d'adaptation de 15 jours (T= 22°C, hygrométrie=60%, photopériode 12h/24h). Ils ont libre accès à l'eau et à la nourriture (Reghaia- Algérie) dont la composition est de : 0.015% protéines, 0.025% matière grasse, cellulose, magnésium, calcium, phosphore, vitamines (A, D3, E), oligo éléments (fer, cuivre, sélénium, cobalt, zinc, iode et manganèse). La quantité de méthionine est de 4.5mg pour 200g d'aliment.

Le choix de ce modèle animal a été fait pour les raisons suivantes :

- Le rat est le mammifère d'expérimentation le plus utilisé et compte pour à peu près 20 % du nombre total de mammifères utilisés dans la recherche.
- il dispose de gènes homologues de presque tous les gènes humains associés à des maladies connues chez l'Homme (Olivier, 2006).
- Une facilité de contention et de manipulation.
- Une résistance vis à vis de diverses contaminations.
- Il représente l'organisme modèle de plusieurs études similaires citées par la littérature. (Matthias *et al.*, 1996)

#### **1.1.2- Traitement des animaux :**

Les animaux sont répartis en deux groupes : contrôle (C) et traité (M) de 8 rats chacun. Les animaux contrôles suivent un régime standard dont la composition signalée ci-

dessus. Ceux du groupe M reçoivent une dose angiotoxique de méthionine (L- méthionine, sigma) par gavage gastrique à raison de 500mg/kg par jour. La durée du traitement est de 8 semaines

A la fin du traitement et après un jeûne de 12 heures, un prélèvement sanguin est réalisé au niveau du sinus caverneux de l'animal à l'aide de microcapillaires stériles. Le sang est récolté sur des tubes secs et EDTA respectivement pour les analyses biochimique et hématologique.

Pour les investigations anatomopathologiques (histologique et immunohistochimique), les animaux sont anesthésiés par du chloroforme, et des perfusions cardiaques au tampon phosphate salin (PBS ; phosphate buffered saline) et au paraformaldéhyde (PFA) à 4% sont réalisées afin de laver et fixer les organes in situ ; le thymus, l'aorte et le foie sont prélevés et fixés dans le formaldéhyde (10%) et conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

## **1.2- Analyse biochimique**

Les dosages effectués sont ceux de l'homocystéine (Hcy), des protéines totales, de la protéine réactive C (CRP) et du malondialdéhyde (MDA).

### **1.2.1- Dosage de l'homocystéine :**

Le dosage de l'homocystéine total a été fait selon la technique immunochimiluminescente effectué par l'analyseur *IMMULITE 2000 Ref : L2KH02*.

Le principe du test est un immunodosage par compétition. Le test inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons. L'homocystéine des échantillons est séparée des protéines de liaison et convertie en S adénosyl homocystéine (SAH) après une incubation de 30 min à 37°C en dehors du système et en présence de S adénosyl-L-Hcy Hydrolase et de dithiothreitol (DTT). L'échantillon prétraité et l'anticorps anti SAH marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 min, le SAH provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et séparé par centrifugation. Le substrat est ajouté et la procédure continue comme décrite pour les immunodosages classiques.

### **1.2.2-Dosage des protéines totales plasmatiques**

Il est réalisé selon la méthode colorimétrique de Bradford utilisant comme réactif le bleu de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250). En milieu acide, le pigment se lie à la protéine par des interactions non-covalentes et sa longueur d'absorption maximale augmente de 465 nm à 595 nm. La densité optique (DO) du rayonnement visible à 595nm est mesurée et permet ainsi de doser indirectement la teneur en protéine de la solution à l'aide d'une courbe d'étalonnage en albumine sérique bovine (BSA, Bovin Serum Albumin) (Bradford, 1976).

Après centrifugation des tubes EDTA, le plasma des différents animaux (125µL) est mis en réaction avec le réactif de Bradford (2ml) dans un volume final (2750µL) d'eau distillée ; parallèlement une gamme d'étalon de BSA (5mg/ml) est préparée. L'absorbance de tous les tubes est mesurée à 595nm après 5min et 1 heure d'incubation à l'obscurité. Les valeurs propres à la gamme étalon permettent de tracer une droite :  $DO = f([BSA])$ . La concentration des protéines totales plasmatiques est exprimée en (mg/ml).

Les préparations : réactifs (Bradford, BSA) et gamme étalon sont mentionnées dans l'annexe 1.

### **1.2.3-Dosage de la CRP**

C'est une protéine synthétisée par le foie à la suite d'une inflammation de l'organisme. Elle est considérée comme un marqueur précoce, sensible et spécifique de la réaction inflammatoire augmentant proportionnellement à son intensité.

Les taux sériques de la CRP sont évalués à l'aide du kit commercial Randox kit (UK) et ils sont exprimés en mg/L.

### **1.2.4-Dosage du MDA dans l'homogénat hépatique**

Le MDA est l'un des produits terminaux résultant de la décomposition des acides gras polyinsaturés médiée par les radicaux libres, son dosage repose sur la réactivité avec l'acide thiobarbiturique (TBA). En effet, deux molécules de TBA se fixent sur une molécule de MDA en milieu acide et à chaud (100°C) pour donner un conjugué coloré absorbant à 530nm et extractible par des solvants organiques tel que le butanol. (Lefèvre *et al.*, 1998 )

Le dosage du MDA est réalisé dans une fraction cytosolique préparée selon la méthode de Lqbal *et al.*, (2003). 1g de foie est broyé dans 3 volumes de PBS (0.1M) contenant 1.17% de KCL à l'aide d'un homogénéiseur (Ultra Turax), l'homogénat est ensuite

centrifugée à 4°C (2000tours /min, 15min) et les fractions cytosoliques sont obtenues après une deuxième centrifugation du surnageant à 4°C (9600tours/min, 30min).

l'évaluation de la peroxydation lipidique est pratiquée suivant la technique de Lefèvre *et al.*, (1996). A 0.5ml de la fraction cytosolique nous ajoutons 0.5ml d'acide trichloracétique (20%) et 1ml de TBA (0.67%). Le mélange est homogénéisé par le vortex, chauffé à 100°C pendant 20min est refroidi puis additionné de 2 ml de n-butanol. Après centrifugation (3000t/min, 15min), la DO des surnageants est mesurée à 530nm et la concentration en MDA est calculée à l'aide d'une gamme étalon utilisant le tétraméthoxypropane. Elle est exprimée en  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de protéines/g de tissu.

### **1.3-Analyse Hématologique (cytologique)**

Les frottis sanguins est intéressant pour une étude morphologique au microscope des éléments figurés. Il recherche des anomalies qui d'emblée permettent d'établir le diagnostic ou fournissent une orientation. Ces anomalies affectent la forme, la taille, la coloration des cellules sanguine ou leur contenu.

Les frottis sanguins périphériques sont préparés avec du sang total (tube EDTA). Une goutte de sang est mise au bord de la lame, étalée sur sa longueur, le film sanguin ainsi obtenu est fixé à l'air libre puis coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG).

### **1.4-Etude Histologique**

Afin d'évaluer les répercussions de l'HH sur la fonction vasculaire, le métabolisme générale et le statut immunitaire et pour compléter d'avantage les études biochimique et cytologique ; un examen anatomophologique est réalisé sur l'aorte, le foie et le thymus respectivement

Les échantillons (aorte, foie, thymus) préalablement fixés dans le formaldéhyde (10%) ont subi d'abord une déshydratation dans des bains d'éthanol de degré croissant : 50%, 60% et 90% (x3) ensuite une inclusion dans la paraffine et coupe (6-8 $\mu\text{M}$  d'épaisseur) à l'aide d'un microtome. Les coupes ainsi recueillies sur les lames sont déparaffinées et réhydratées en les immergeant dans le xylène (x2) puis dans des bains d'alcool décroissants : 100%, 90% et 70% et finalement dans un bain d'eau distillée. Les coupes sont colorées à l'Hématoxyline- Eosine (Sigma, Annexe 2) : L'hématéine est une substance basique qui colore les noyaux en violet alors que L'éosine est une substance acide qui colore plutôt les cytoplasmes en rose . En fin les lames sont montées pour l'observation au microscope optique (EXACTA + OPTTECH GMBH-MÜNchen, Germany) équipé d'une caméra (Canon DS126181, Japan).

## **1.5- Révélation du VEGF-A par marquage immunohistochimique**

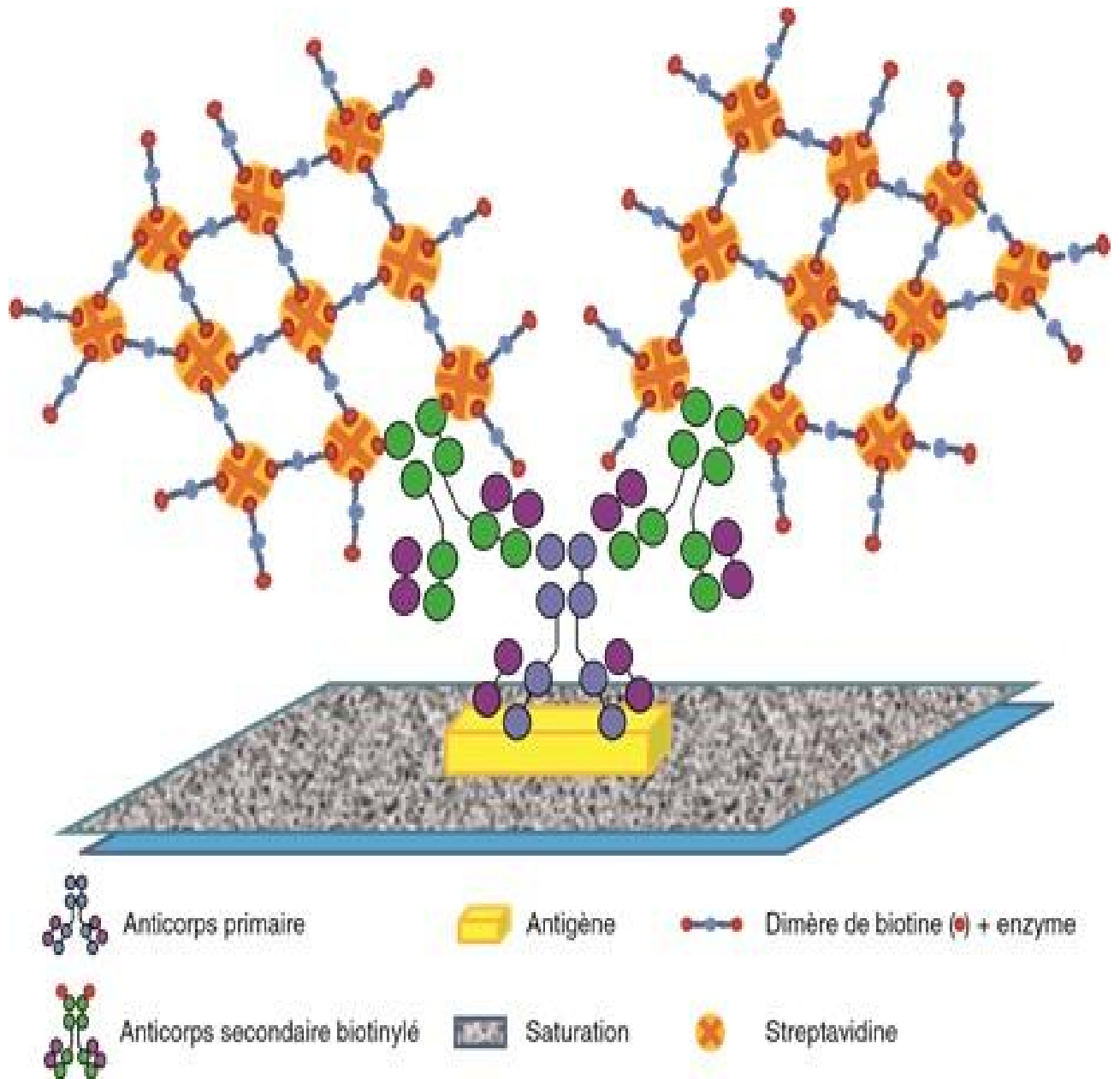
C'est une technique associant l'immunologie et l'histochimie, elle permet la mise en évidence d'antigènes tissulaires ou cellulaires grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques. La visualisation des complexes antigène-anticorps se fait par l'intermédiaire de marqueurs. Deux enzymes sont couramment utilisées comme système de révélation en microscopie optique ; la peroxydase de raifort et la phosphatase alcaline.

Pour notre étude, le marquage du VEGF-A sur les coupes thymiques issues de rats contrôles et traités est pratiqué suivant le kit ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System (Santa-Cruz Biotechnology) qui est basé sur une méthode d'IHC indirecte dite ABC (Avidin–Biotin Complex) utilisant la peroxydase de raifort (*horseradish peroxidase* ou HRP) comme traceur et le complexe Avidine- Biotine comme système d'amplification.

### **Principe**

La biotine est conjuguée à l'anticorps (anticorps biotinylé) et l'avidine à l'enzyme, toutes deux de façon covalente. En effet, jusqu'à quatre molécules de biotine peuvent se lier à une molécule d'avidine. L'addition à la réaction finale de molécules de biotine bivalentes (liées à l'aide d'un agent réticulant ou *linker*) couplées à l'enzyme et d'avidine permet la formation de volumineux complexes dans lesquels les sites restés libres de l'avidine reconnaissent la biotine de l'anticorps conjugué. (figure 19).





**Figure 19** : Représentation schématique du système d'amplification du complexe avidine-biotine (ABC). (D'après ASSIM, 2014)

## **•Réalisation**

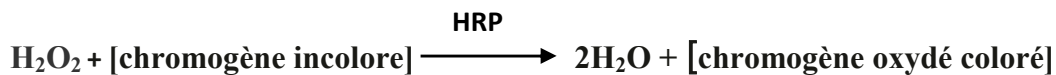
Après inclusion des segments thymiques dans la paraffine (la même procédure de l'étude histologique), une coupe de 5µm est réalisée via le microtome. Le ruban obtenu est récupéré sur des lames silanisée préalablement humidifiées avec de l'eau distillée, le tout est placé sur une plaque chauffante pour mieux déplier les coupes recueillies. Ensuite les sections sont déparaffinées dans 2 bains de xylène (10min chacun), lavées dans des bains d'alcool benzylique à 96 %, 80 % et 70 % (5 min chacun) et enfin réhydratées dans l'eau distillée (5min). Ainsi les coupes thymiques obtenues sont prêtes pour l'IHC dont le protocole est ci- dessous

### **Protocole de l'ABC :**

La procédure est assez longue et complexe, elle se résume en huit étapes essentielles :

- 1) *Inhibition des peroxydases endogènes* : en incubant la coupe thymique dans du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 3% pendant 30 min suivie de deux lavages au PBS (5min chacun).
- 2) *Démasquage thermique de l'antigène* : en immergeant les lames dans la solution tampon (Tris-EDTA buffer, pH 9.0, 0.05% Tween (TWEEN® 20, Sigma)) puis les incubent à 95°C dans un bain-marie pendant 15 min et les laisser refroidir dans le tampon puis lavées au PBS.
- 3) *Blocage des sites aspécifiques* : réalisé en saturant les lames par la BSA (Sigma) à 1% pendant 30min.
- 4) *Incubation de l'anticorps primaire* : les lames sont égouttées afin d'éliminer l'excès de sérum puis elles sont couvertes avec 250µL de l'AC I (Rabbit polyclonal VEGF antibody, Santa-Cruz Biotechnology) dilué à 1 :100 dans un mélange tampon (PBS, BSA (30%) et Tween (0.1%)) puis incubées toute la nuit dans une chambre humide.
- 5) *Application de l'anticorps secondaire biotinylé* : après lavage, les sections sont couvertes de 250µL de la solution d'anticorps (anti-rabbit biotinylated antibody, Santa-Cruz Biotechnology) dilué à 1 :100 comme précédemment. En laisse incubent pendant 1 heure puis on rince au PBS (2x ,5min).

- 6) *Addition du réactif amplificateur ImmunoCruz ABC Reagent (1/100)*; préalablement préparé selon les instructions du fournisseur. L'incubation est de 2 heures.
- 7) *Révélation du complexe via le chromogène 3, 3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma)* : en présence de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) la peroxydase catalyse l'oxydation du substrat DAB en un produit de couleur marron, d'après la réaction ci-dessous (Tsang *et al.*, 1984).



Les sections sont ainsi incubées avec 500 $\mu$ L de DAB pendant 10min. ensuite lavées avec le PBS (x2, 5min).

- 8) *Coloration et montage des lames* : les préparations thymiques obtenues sont contre colorées à l'Hématoxyline Mayer (Sigma), puis montées à l'aide de l'Entellan pour l'observation au microscope optique et la prise de photos.

## **1.6-Quantification de l'expression aortique des gènes (VEGF et HIF-1 $\alpha$ ) par La qRT-PCR**

La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR. Ainsi une RT-PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent au cours de chaque cycle.

### **Protocole :**

La qRT-PCR est pratiquée sur les homogénats d'aortes des lots C et M préalablement conservés dans l'azote liquide (-196°C). La technique est réalisée en 4 étapes :

#### **1)Extraction et purification des ARN totaux :**

Les ARNs totaux sont obtenus via le réactif Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) dont le principe est inspiré de la méthode de Chomzynski *et al.*, 1987. Le réactif est une combinaison de thiocyanate de guanidine et du phénol, pour une inhibition immédiate et efficace de l'activité RNase. Le protocole de l'extraction est synthétisé comme suit :

- ▶ Homogénéisation : 1 ml TRI REAGENT + 50 - 100 mg tissus, 5 - 10 x 10<sup>6</sup> cellules.
  - ▶ Séparation des ARN : homogénat + 0.1 ml BCP ou 0.2 ml chloroforme puis centrifugation (12000xg, pendant 15min à 4°C)
  - ▶ Précipitation des ARN : phase aqueuse + 0.5 ml isopropanol et centrifugation (12000xg, pendant 15min)
  - ▶ lavage (x2) des ARN : 1 ml 75% éthanol, et centrifugation (12000xg, pendant 10min).
  - ▶ Solubilisation dans 50 $\mu$ l Eau distillée ultra pure.
- ▶ Analyse de la qualité d'ARN

Les quantités d'ARN sont analysées directement dans leurs solutions aqueuses sous forme diluée (1/50) dans un tampon TE (10mM Tris + 1mM EDTA), la concentration ( $\mu$ g/ml) est déterminée par une mesure de l'absorbance (DO) à 260 nm contre le « blanc ». Le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0.

## **2) Transcription inverse**

Les ADNc sont synthétisés suivant le kit Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega).

On procède d'abord par la préparation du mélange réactionnel (1) de (10 $\mu$ l) : 1 $\mu$ g ARN+ 1  $\mu$ L oligo dT (20 $\mu$ M) + qsp H<sub>2</sub>O, puis Incubation 10min à 70°C, et enfin le mélange est refroidis 1 min sur la glace.

Ensuite, on additionne au mélange (1) un second mélange contenant : 4 $\mu$ L du Tampon (M-MLV RT 5X Reaction Buffer), 2 $\mu$ L dNTP, 1 $\mu$ L RNase OUT et 1 $\mu$ L M-MLV Reverse Transcriptase. Enfin on réalise une incubation pendant 50min à 37°C puis 15min à 70°C.

## **3) Exécution de la Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

### **Principe :**

La qRT-PCR (Quantitative Reverse Transcriptase -PCR) couple une RT-PCR classique à une méthode de quantification fluorescente. La cinétique de quantification est basée sur la détection « en temps réel » du signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de produit PCR généré au cours de l'amplification.

La technologie basée sur le SYBER Green ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces. Lors de la réaction d'amplification, le colorant libre en solution exhibe peu de fluorescence. Durant l'étape d'élongation, une augmentation de la fluorescence est associée à la quantité de colorant se fixant à l'ADN double brin naissant. Lorsque suivi en temps réel, l'augmentation du signal de fluorescence est observée pendant l'étape de polymérisation et l'émission fluorescente décroît complètement lorsque l'ADN est dénaturé à l'étape suivante.

Conséquemment, l'émission de fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation pour chacun des cycles par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel qui permet de suivre l'augmentation de la quantité d'ADN amplifié durant la réaction (Bustin, 2000). (figure 20.A)

### **●Réalisation :**

► Configuration de la plaque de PCR.

Dans chaque micropuit de la plaque, on introduit 15µl du mélange réactionnel ; c'est le volume total de 5µl de l'ADNc et 10µl du Mix SYBR Green dont la composition est de : 7.5µl SYBR Green (B-R SYBR® Green SuperMix, Quanta Biosciences), 0.5µl de l'amorce sens, 0.5µl de l'amorce anti sens et 1,5µl d'H<sub>2</sub>O ultra pure. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 5.

► Programmation du Thermocycleur (DNA Engine Opticon®2, MJ Research Inc) :

- Activation enzymatique à 95 °C pendant 20 sec - 3 min (1 cycle)
- Dénaturer à 95 °C pendant 1 - 3 sec
- Appariement/Elongation/Acquisition à 60 °C moins de 20 sec. Faire 40 cycles des 2 derniers points

**Tableau 5 : Identification des amorces utilisées en qRT- PCR**

<i>gènes</i>	<i>Amorces</i>
<i>Rat-beta actine</i>	F 5'-CCTTCTTGCGCTCCTCCGT- 3'
	R 5'-CCTTCTGACCCATACCCACC- 3'
<i>Rat-VEGF-A</i>	F 5'-GCAATGATGAAGCCCTGGA- 3'
	R 5'-GGCTCACAGTGATTTTCTGGC- 3'
<i>Rat-HIF-1alpha</i>	F 5'-GAACAAAACACGCAGCGAAG- 3'
	R 5'-ACAAATCAGCACCAAGCACG- 3'

#### 4) Analyses des données

La quantification du signal repose sur le concept de cycle threshold (Ct) où le Ct correspond au plus petit nombre de cycles pour lequel l'intensité du signal fluorescent est supérieure au bruit de fond (Bustin, 2000). (figure 20.B ), (Annexe 3)

L'expression relative des ARNm est basée sur la différence des Ct ( $\Delta Ct$ ) selon la méthode de Livak *et al.*, 2001. La première étape consiste à utiliser le Ct du gène de référence (Beta-actine), en calculant ainsi :

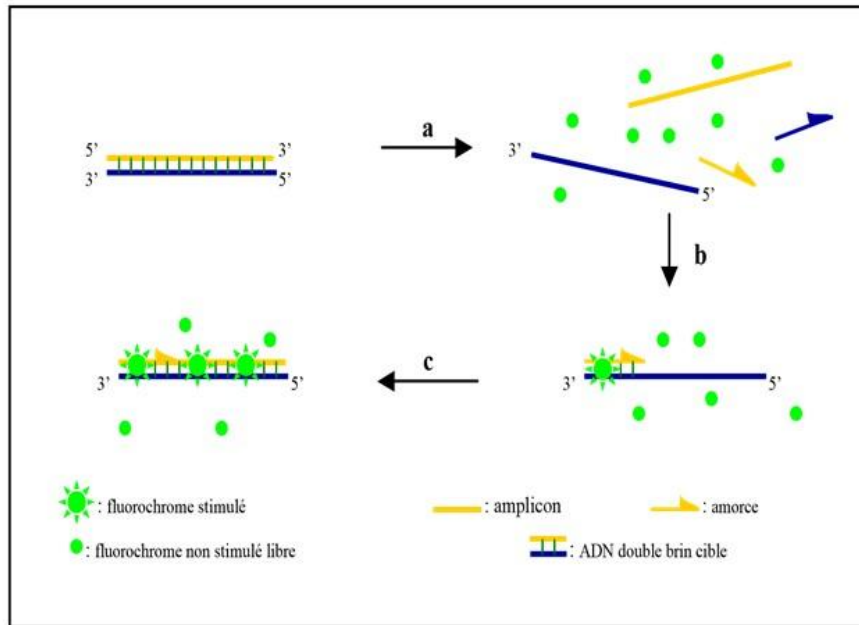
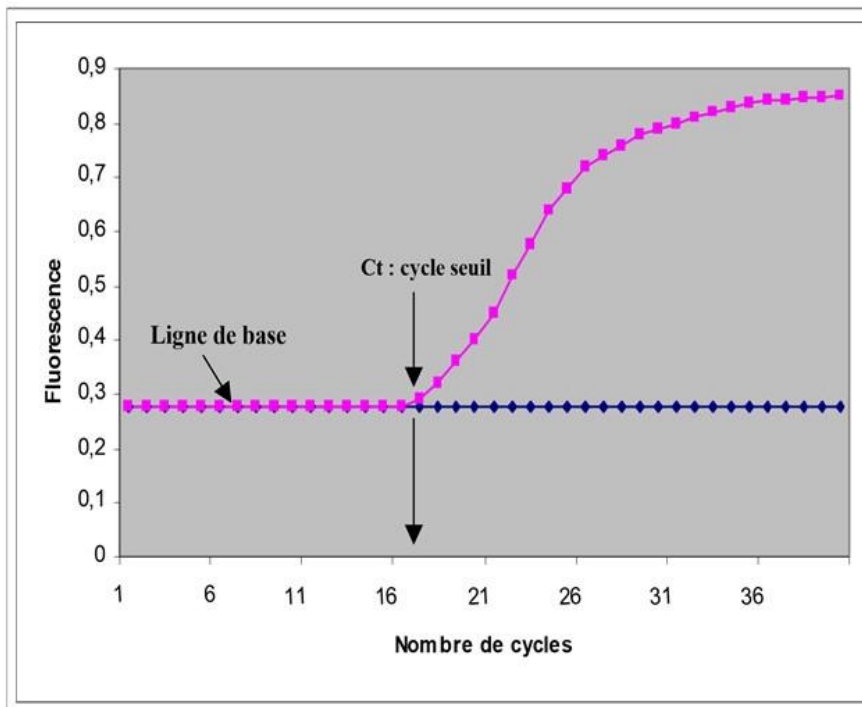
$$\Delta Ct = Ct (\text{gène cible}) - Ct (\text{gène de référence})$$

La comparaison des Ct entre les échantillons traités et échantillons témoins détermine le  $\Delta\Delta Ct$  :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{traité}) - \Delta Ct (\text{témoin})$$

Le rapport du taux d'ARN (Q) entre les échantillons traités et échantillons témoins est donné par la formule :

$$Q = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

**A****B**

**Figure 20 : Principes de la PCR en temps réel. A : principe d'action du SYBR Green I.** (a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre exhibe peu de fluorescence. (b) durant l'hybridation quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant résultant en une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant l'élongation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut-être suivi en temps réel. **B : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles** (D'après Poitras *et al.*, 2002)



## **2- L'étude *in vitro***

Elle a pour objectif de vérifier l'effet antiangiogénique de l'homocystéine à l'échelle cellulaire et moléculaire selon deux séries de concentrations distinctes : la première est d'ordre mili-molaire, reconnue dans la littérature comme étant des concentrations cytotoxiques. Et une deuxième d'ordre micro-molaire répondant aux valeurs physiopathologiques.

### **2.1-Matériel biologique**

#### **2.1.1- L'aorte du rat :**

Les segments aortiques utilisés sont ceux de l'aorte thoracique, ils servent à installer un modèle d'angiogenèse *ex-vivo*, permettant ainsi d'interpréter ce processus dans un cadre complet : dégradation de la matrice, la migration, la prolifération et la réorganisation des cellules endothéliales.

#### **2.1.2- lignée cellulaire :**

Les cellules choisies pour effectuer cette étude sont des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), la lignée est dite (HUVEC C-12200) fournie par PromoCell (France). Leur mise en culture est réalisée selon les instructions du manuel correspondant.

En raison de leur relative facilité d'obtention, ces cellules sont largement utilisées dans la littérature comme modèle expérimental, notamment dans de précédentes études s'intéressant à l'angiogenèse.

#### **●Entretien de la culture**

La mise en culture des HUVECs est faite dans des boîtes de pétri coatée (gélatine 1%) et contenant un milieu adéquat dit Endothelial Cell Growth Medium 2 (ECGM 2 : C-22011, PromoCell). Une fois ces dernières sont à confluence (70%-90%) dans la boîte de culture, le milieu est éliminé et les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS. Ce lavage permet d'une part d'éliminer le sérum qui inhibe l'activité enzymatique de la trypsine, et d'autre part de libérer des ions Ca<sup>2+</sup> qui secondairement faciliteront l'adhésion des CEs. La solution de digestion (trypsine/EDTA, Annexe 4) est ajoutée à la boîte. Le détachement du tapis cellulaire est contrôlé au microscope optique inversé et l'action enzymatique de la trypsine est stoppée par effet de protéine en ajoutant 5ml de milieu complet. Cette suspension cellulaire est centrifugée (200xg, 6min) puis remise en suspension dans du milieu complet.

Un comptage des cellules et une estimation de la viabilité cellulaire sont ensuite effectués dans une cellule Malassez afin de suspendre la suspension cellulaire dans un volume de milieu adéquat pour obtenir la concentration cellulaire (Nb cellules/mL) voulue.

Ce protocole d'entretien est pratiqué dans l'ensemble de nos expériences, tout en respectant le nombre de passage (P4-P6).

## **2.2- Expérimentations**

### **2.2.1-Evaluation de l'effet d'homocystéine sur l'angiogenèse**

#### **A- Gamme cytotoxique de l'homocystéine**

##### **A.1- Modèle de l'anneau aortique (Aortic Ring Assay) :**

###### **●Principe :**

c'est une culture d'organe initialement développée par Nicosia *et al.*, (1990) dont le but est de tester l'effet des agonistes ou antagonistes angiogéniques et d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'angiogenèse. Dans ce système, les anneaux aortiques cultivés dans un gel de collagène donnent lieu à des réseaux microvasculaires composés de canaux de ramifications endothéliales. En utilisant des explants vasculaires intacts, il reproduit avec plus de précision l'environnement dans lequel a lieu l'angiogenèse que ceux avec des cellules endothéliales

###### **●Réalisation :**

Le rat est sacrifié par dislocation cervicale. L'aorte thoracique est prélevée, nettoyée de son tissu adipeux et coupée en anneaux de 2- 3 mm de longueur dans le PBS. Dans une plaque de 24 puits, les segments de l'aorte sont placés en culture dans un milieu minimum essentiel de Eagle (MEM :M-2279, sigma) supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF : 10%) et d'antibiotique (la gentamicine : 0,1 %). Après 48 heures d'incubation ( $T=37^{\circ}\text{C}$ ,  $P_{i\text{CO}_2}=5\%$ ), on fait exposer notre culture à l'Hcy (DL-Homocysteine, sigma) suivant deux concentrations (2 et 5mmole). une prise de photos est réalisée au J3 et J5 de la culture via le microscope inversé Eclipse TS100 (Nikon).

## A.2- Test de prolifération des HUVECs

### Principe :

C'est un test reproductible et quantifiable, la méthode la plus simple consiste à compter les cellules viables avec un hémocytomètre et un colorant vital (e.g. bleu de trypan), ou un compteur électronique type Coulter. (Staton *et al.*, 2004)

### ●Réalisation :

Les HUVECs sontensemencées dans une plaque coatée de 24 puits ( $16 \times 10^3$  cellules/puit) et incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après 24 heures, on fait remplacer le milieu usé (ECGM2) par un autre frais contenant les différentes concentrations d'Hcy (2, 4 et 8mM). La prolifération cellulaire est évaluée après 24 heures via le Compteur de cellules automatique (Z<sup>TM</sup> series COULTER COUNTER®).

## A.3- Test de migration des HUVECs par cicatrisation (wounding assay).

### Principe :

Il permet d'estimer l'effet d'une molécule sur la migration des cellules endothéliales. Son principe est comme suit : une mono-couche de cellules est cultivée *in vitro* et une plaie artificielle est créée mécaniquement. Le résultat est typiquement une région aux frontières parallèles. Par la suite, les cellules vont migrer pour fermer cette plaie. L'évolution de ce processus de migration est surveillée par la prise de photos généralement pour une période de plusieurs heures à quelques jours(Staton *et al.*, 2004). (figure 21)

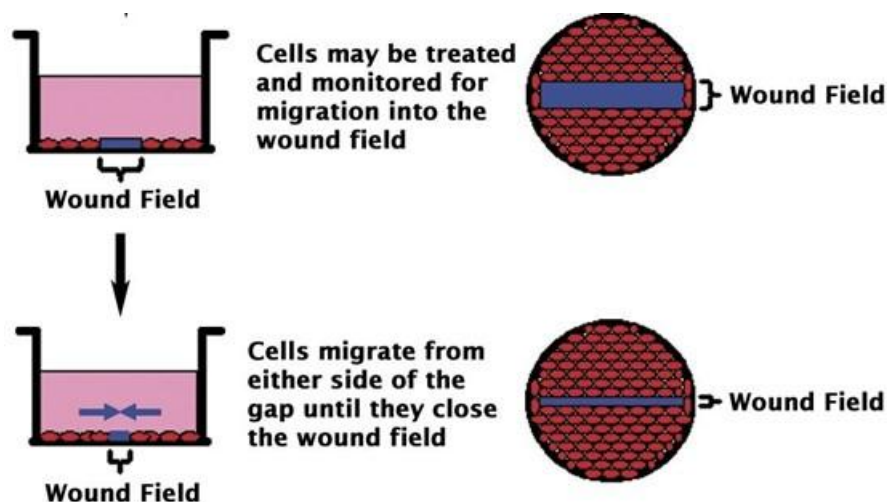


Figure 21 :Représentation schématique du test de blessure (D'après le Kit Wound Healing Assay Kit - Cell Migration Assay | Cell Biolabs, Inc)

**●Réalisation :**

Les HUVECs ( $40 \times 10^3$  cellules/puit) sont cultivées dans une plaque de 12 puits préalablement coatée (gélatine 1%). Après 24 heures (état de confluence), le milieu complet est chassé et les HUVECs sont incubées dans un milieu basal additionné de 5% de SVF ; afin de garder les cellules en état de quiescence : condition physiologique de l'angiogenèse.

Après 24 heures une scratch est réalisée au centre du puit via l'embout d'une micropipette, le milieu usé est aspiré et les cellules sont incubées à nouveau dans le milieu complet ECGM2 en présence des différentes concentrations d'Hcy (0.5, 1, 2mM).

Avant incubation, la rayure est observée sous microscope inversé (Diaphot 300, Digital Sight DSFi1 camera, Nikon), photographiée pour en déterminer sa largeur initiale. La migration est évaluée en mesurant la largeur de la strie (en pixels) en 2 temps d'incubations :  $t=6h$  et  $t=20h$ . Les résultats sont présentés en pourcentage de recouvrement de la plaie.

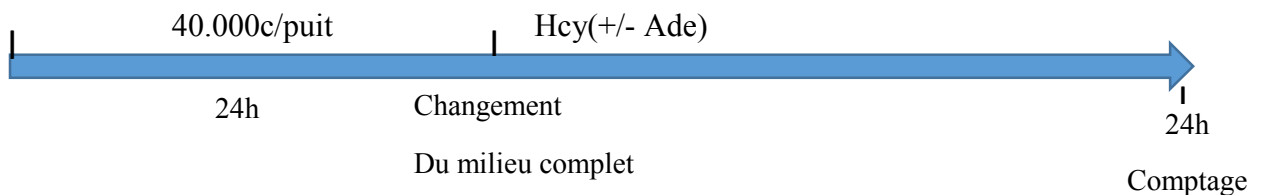
**B-Gamme physiopathologique de l'Hcy**

Afin d'évaluer l'effet antiangiogénique de l'Hcy à des concentrations cliniques, les mêmes principes de l'investigation précédente ont été respectés. Cela en absence ou en présence d'adénosine (Ade)

**B.1- Test de prolifération des HUVECs**

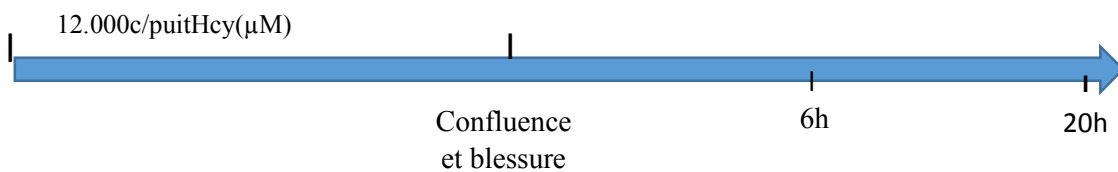
Les HUVECs ( $40 \times 10^3$  cellules/puit) sont incubées dans une plaque coatée de 24 puits (gélatine 1%) pendant 24 heures, puis exposées à l'Hcy suivant une série de dilution en ( $\mu M$ ) : 10, 25, 50, 100 et 200. Après 24 heures, un comptage cellulaire est réalisé via le Coulter.

En parallèle, une culture combinée d'Hcy et d'Ade ( $50 \mu M$ ) est pratiquée dans les mêmes conditions. Un comptage est effectué après 24h d'incubation.



## **B.2- Test de migration des HUVECs :**

Les cellules (12.000cellules/ml) sont mises en confluences dans le milieu complet ECGM2, ensuite une rayure est faite du bord au bord du puit. Le milieu est changé et les HUVECs sont réincubées avec les concentrations voulues d'Hcy. La migration est quantifiée en pourcentage (comme précédemment) au fil du temps (t0, t6 et t20). Sachant que t0 (avant incubation), t6 (après 6h d'incubation) et t20 (après 20h d'incubation),



### **2.2.2- Evaluation de l'effet d'Hcy sur l'expression génique du VEGF-A et de l'OPN**

Les ARNs sont isolés à partir des HUVECs (20.000 cellules) prétraitées par les différentes concentrations d'homocystéine via le Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc). Le déroulement de la qRT-PCR a suivi le même protocole que celui de la partie *in vivo*. En bref ; les ARNs totaux (1μg) sont rétrotranscrit par la transcriptase inverse (M-MLV reverse transcriptase, Promega) puis l'amplification de l'ADN complémentaire est réalisée dans le thermocycleur (DNA Engine Opticon®2, MJ Research Inc) appliquant le colorant SYBR Green (B-R SYBR® Green SuperMix , Quanta Biosciences).

La quantification relative de chaque ARNm est calculée par la méthode comparative du Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) en utilisant la Beta-actine comme gène de référence. Les séquences d'amorces de chaque gène sont représentées dans le tableau 6.

**Tableau 6: Identification des amorces utilisées en qRT- PCR**

	<i>Amorces</i>
<i>beta actine</i> ( <i>Humain</i> )	F 5'-GGAGGAGCTGGAAGCAGCC-3' R 5'-GCTGTGCTACGTCGCCCTG-3'
<i>VEGF-A</i> ( <i>Humain</i> )	F 5'-GTGCCCACTGAGGAGTCCA-3' R 5'-TCCTATGTGCTGGCCTTGGT-3'
<i>OPN</i> ( <i>Humain</i> )	F 5'-GGAAAGCGAGGAGTTGAATGG-3' R 5'-AATCAGAAGGCGCGTTCAG-3'

### 3-Analyse statistique

L'évaluation de L'ensemble des résultats obtenus est réalisée à l'aide des logiciels informatiques de traitement statistique :

-Microsoft Excel (2010) : pour l'établissement des graphes ( $m \pm SEM$ ).

-BioStast Professional 2009 (version 5.8.4.3) : pour le test-t de Student au seuil ( $\alpha = 5\%$ ).

ns : différence non significative ; (\*) :  $p \leq 0,05$  ; (\*\*) :  $p \leq 0,01$  ; (\*\*\*) :  $p \leq 0,001$

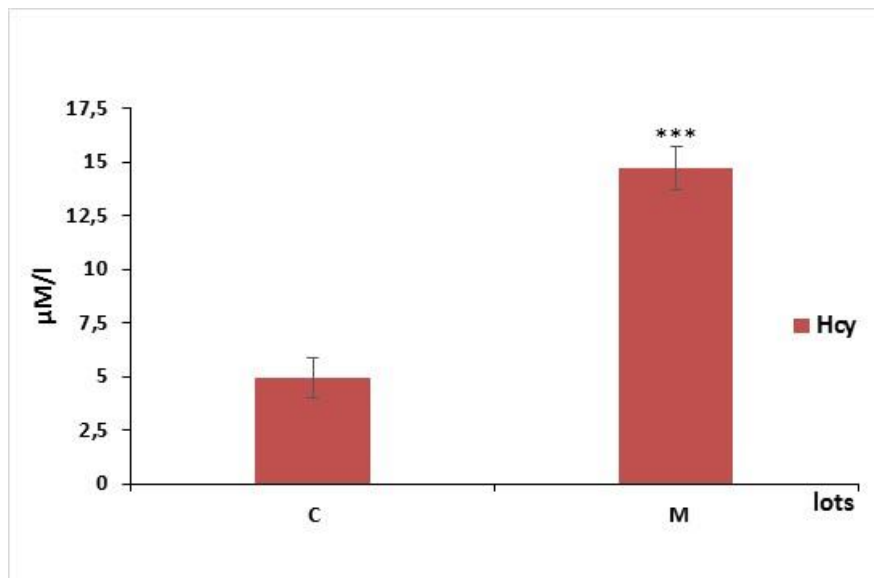
## *Chapitre 3 : Résultats*

## 1-Résultats relatifs à l'étude *in vivo*

Dans cette première partie, nous visons à explorer l'implication de l'hyperhomocystéinémie (induite par une dose angiotoxique de méthionine) dans le processus d'angiogenèse en s'intéressant d'une part à l'aorte ; siège préférentiel du dysfonctionnement endothéliale et d'autre part au thymus ; siège d'éducation et de maturation de LT et aussi un point de passage pour les CE progénitrices (complicité dans l'angiogenèse tumorale).

### 1.1-Détermination du taux plasmatique d'Hcy

Les niveaux plasmatiques de l'Hcy sont très affectés chez les rats supplémentés en méthionine ; on note une augmentation très significative ( $p < 0.001$ ) par rapport aux contrôles. (figure 22)



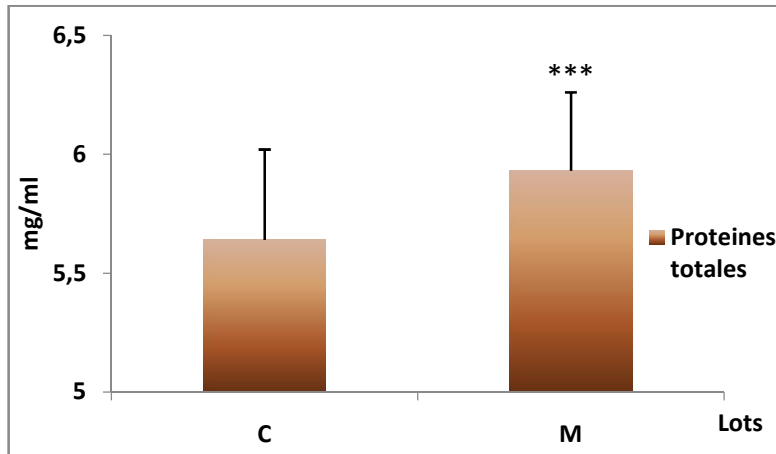
**Figure 22** : Evaluation du taux d'Hcy chez les rats supplémentés en méthionine



## 1.2-Evaluation du statut inflammatoire

### 1.2.1-Protéines totales plasmatiques :

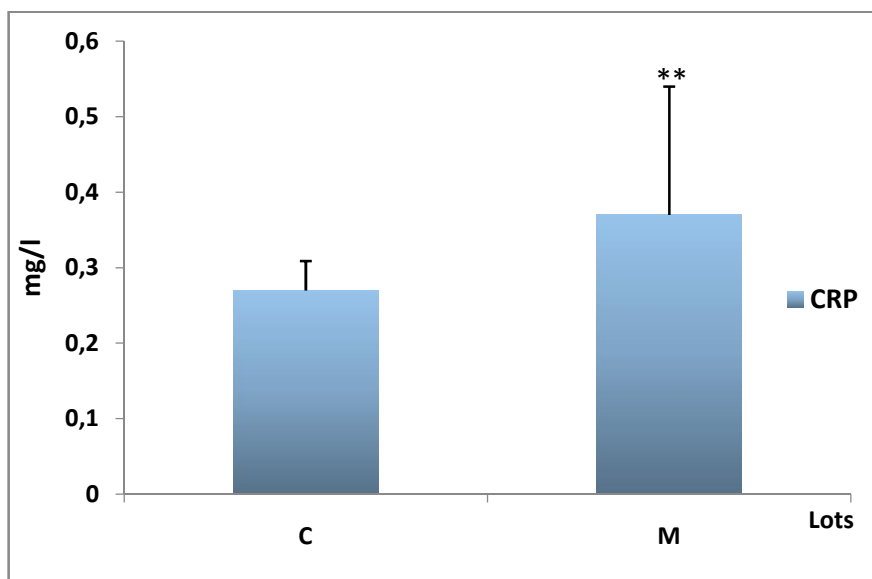
Letaux plasmatiques des protéines totales varie d'une manière très prononcée entre les groupes d'animaux ; on note une augmentation hautement significative ( $P < 0.001$ ) chez le lot M par rapport au lot contrôle. (figure 23)



**Figure 23 :** Evaluation du taux de protéines totales chez les rats supplémentés en méthionine

### 1.2.2-La CRP :

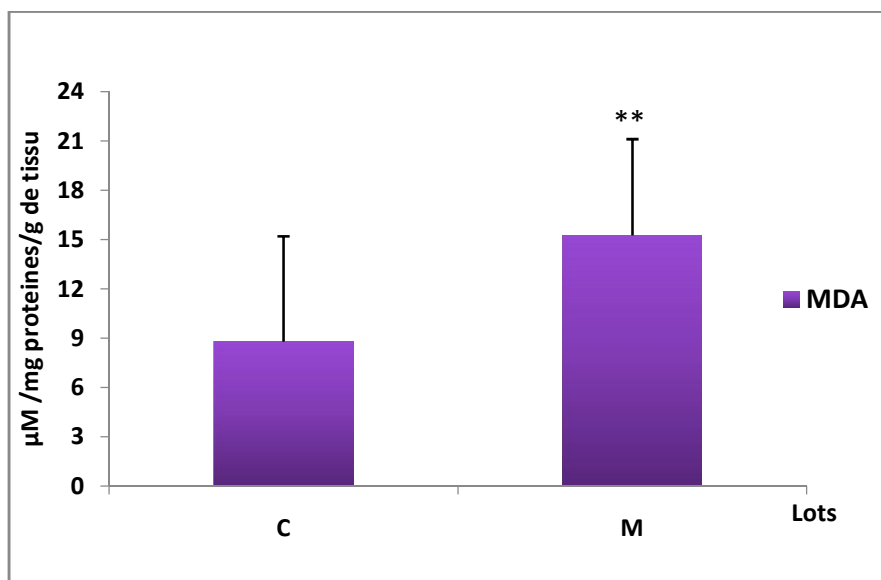
Le niveau sérique de la CRP est très influencé par le régime hyperhomocystéinémique ; on enregistre une augmentation très significative ( $P < 0.01$ ) par rapport au contrôle. (figure 24)



## **Figure 24 : Evaluation de CRP chez les rats supplémentés en méthionine**

### **1. 3- Effet de l'hyperhomocystéinémie sur le MDA**

La détermination du stress oxydatif a été fondée sur la peroxydation lipidique par la mesure du taux de malondialdéhyde hépatique. Nous avons constaté une augmentation très significative ( $P < 0.01$ ) du MDA tissulaire chez le lot M par rapport au lot contrôle. (figure 25)



## **Figure 25 : Evaluation du taux MDA chez les rats supplémentés en méthionine**

On a voulu tester les répercussions de d'une augmentation des taux d'Hcy sur le MDA et donc d'autres enzymes devraient être quantifiées pour étudier d'éventuelles corrélations entre le statut oxydant, l'HH, l'oxygène et les processus tumorale.

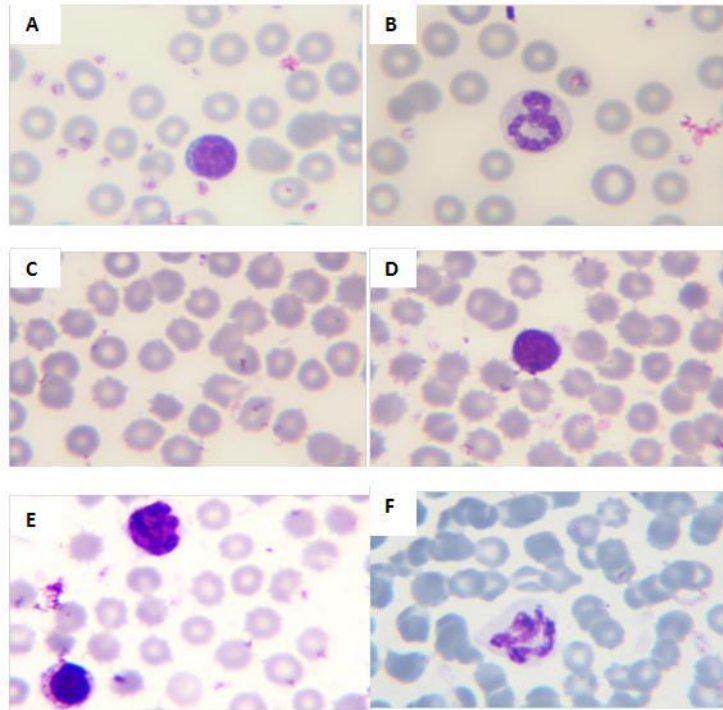
### **1.4-Effets sur le profil Hématologique**

L'analyse du frottis sanguin correspondant au lot M, révèle des modifications morphologiques marquées affectant principalement les hématies et les leucocytes. Elles se traduisent par :

-une présence de sphérocytes : hématies évoquant des sphères, ayant un diamètre inférieur à celui du discocyte mais plus épaisses, ne possédant pas de zone claire centrale et de contenu dense et hyperchromatique. (figure 26C)

-une présence d'acanthocytes : hématies crenelées émettant quelques spicules (2 à 12 par définition), de longueur variable, denses, et qui se projettent à partir de la surface du GR et à intervalles irréguliers. (figure 26D)

- des lymphocytes et des monocytes ont une chromatine défective ; noyaux irréguliers..(figure 26E)
- des polynucléaires plurisegmentés mais également rubanés.(figure 26F)



**Figure 26 : Anomalies hématologiques chez les rats supplémentés en méthionine(400x).lot C (A, B) ; lot M (C, D, E,F). (D'après Aggoun *et al.*, 2015)**

## 1.5-Résultats de l'étude histologique :

### 1.5.1-Histologie Aortique

Les photomicrographies des lots C et M présentent une hétérogénéité structurale :

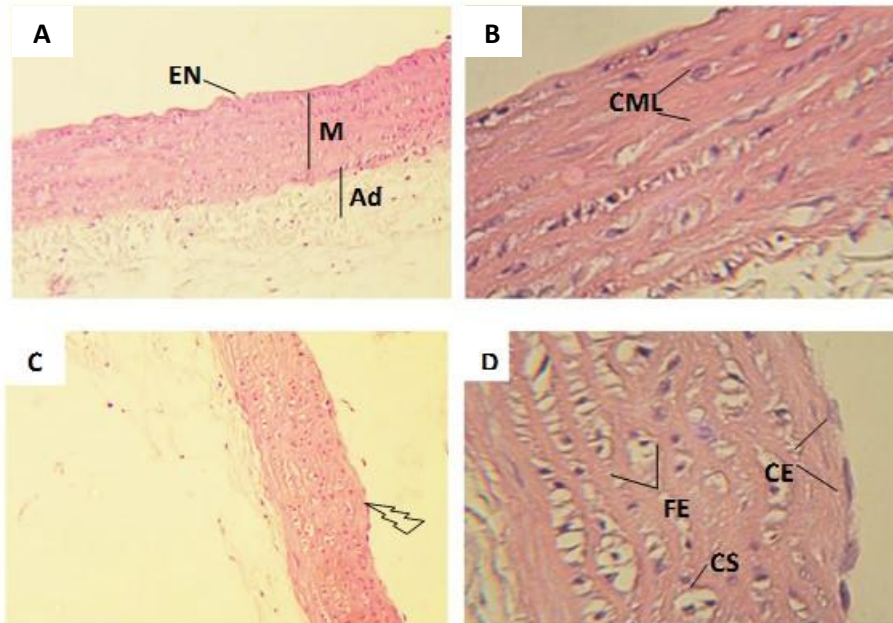
- Pour le lot C(figure 27 A, B), les observations de l'aorte thoracique montre une architecture trilamellaire bien respectée, déterminée de l'intérieur à l'extérieur par :

- une intima déterminée par un endothélium (EN) simple et continu.

- une média (M), composée d'un réseau élastique constitué de lames élastiques, fenêtrées et concentriques renfermant un nombre de cellules musculaires lisses (CML).

- une adventice (Ad) qui est un tissu conjonctif peu organisé formé de collagène et de fibroblastes.

● Pour le lot M (figure 27 C, D), l'aorte thoracique est caractérisée par un endothélium (EN) irrégulier et discontinu se traduisant par un détachement des CE, un épaissement (⚡) de la media accompagné d'une désorganisation des fibres élastiques (FE) et une présence importante de cellules spumeuses (CS).

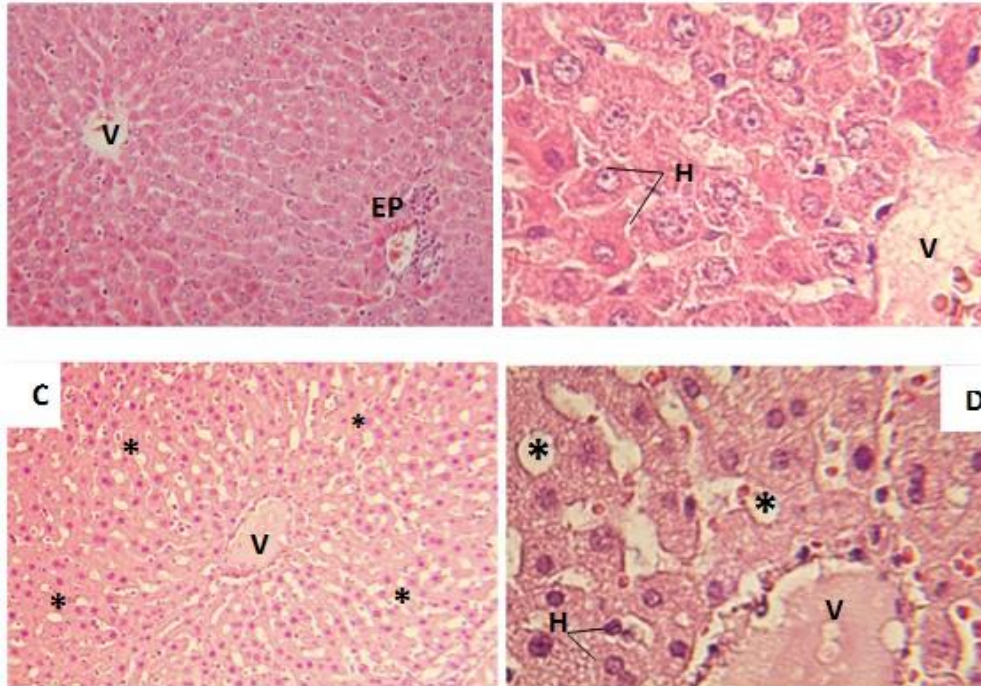


**Figure 27:** Anomalies histologiques de la paroi artérielle chez les rats supplémentés en méthionine. Lot C (A.100x ; B.400x), lot M (C.100x ; D.400x)

### **1.5.2-Histopathologie hépatique**

Chez le lot contrôle (figure 28 A, B), la coupe transversale du parenchyme hépatique renferme les caractéristiques principales de ce tissu. Il est constitué de lobules, schématiquement hexagonaux, avec un espace porte à chaque sommet. Les lobules sont centrés par une veine centrolobulaire (V), l'espace porte (EP) est constitué d'un tissu conjonctif contenant : une branche de la veine porte ; une branche de l'artère hépatique ; un ou plusieurs canaux biliaires interlobulaires. Les hépatocytes (H) sont disposés en travées et séparés par les sinusoides. Les sinusoides sont bordés de cellules endothéliales et de cellules de Küpffer (histiocytes tissulaires). Les sinusoides drainent le sang provenant de l'espace porte vers les veines centrolobulaires (qui se drainent vers les veines sus-hépatiques).

Chez le lot traité (figure 28 C, D), l'observation microscopique montre une stéatose (\*) hépatique : microvisculaire caractérisée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques principalement dans le cytoplasme et des hépatocytes en arrangement hétérogène, souvent binucléés



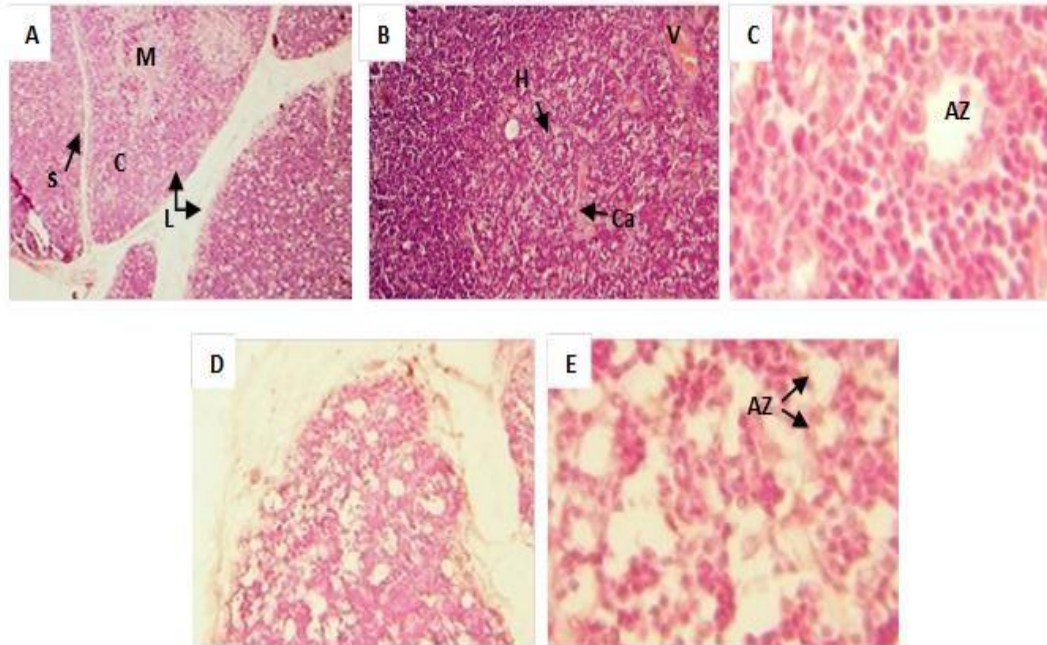
**Figure 28:** Anomalies histologiques du foie chez les rats supplémentés en méthionine. lot C (A.100x ; B.400x), lot M (C.100x ; D.400x)

### 1.5.3-Histopathologie thymique

les photomicrographies contrôles montrent que le thymus est organisé en plusieurs lobules (L) délimités par des septa interlobulaires (S) contenant les vaisseaux sanguins et divisé en deux zones distinctes : un cortex (C) de couleur dense, peuplé de thymocytes et une médullaire (M) d'aspect pale renfermant essentiellement des cellules épithéliales, des corpuscules de Hassal (H), des lymphocytes matures et des composantes vasculaires : veines (V) et capillaires (C) (figure 29 A,B). A fort grossissement, on observe le cortex avec quelques zones apoptotiques (figure 29C). Par ailleurs, les photomicrographies du lot M révèlent que le thymus est déjà engagé dans le processus d'involution qui se manifeste par deux phénomènes distincts ; une infiltration graisseuse et une déplétion lymphocytaire (figure



29D). A fort grossissement le tissu thymique se montre bourré de zones apoptotiques (figure 29E)

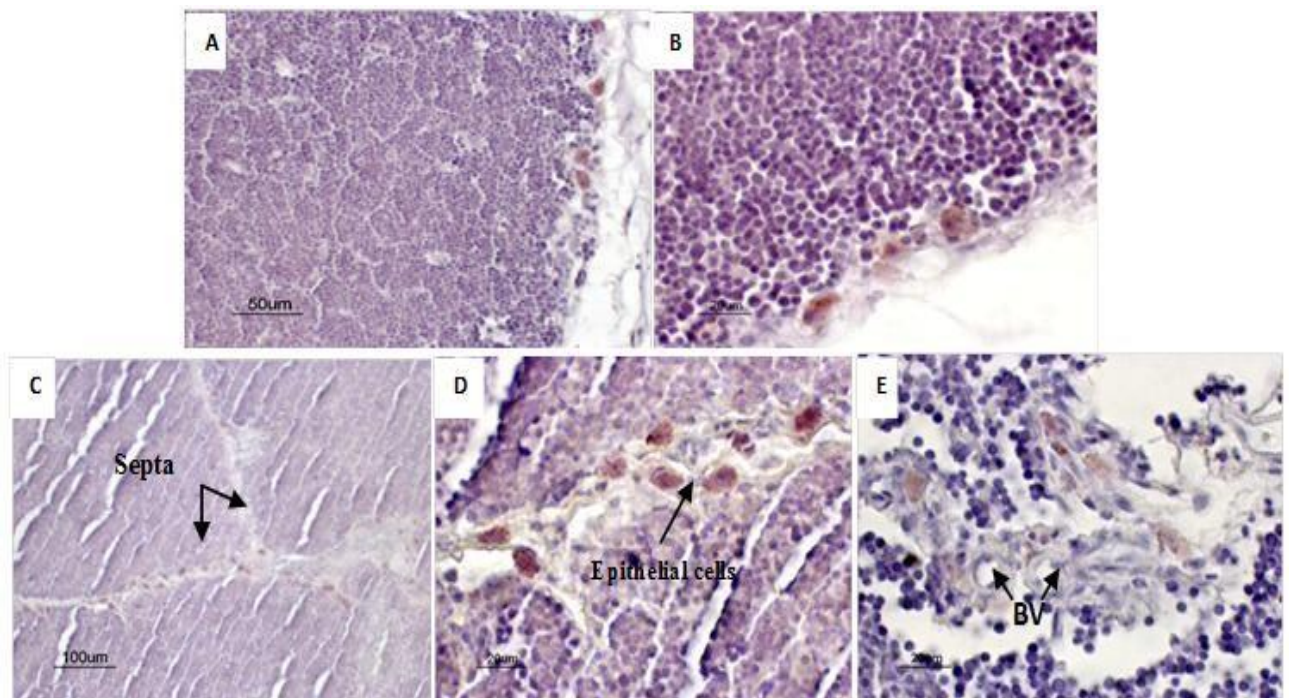


**Figure 29** : Anomalies histologiques du thymus chez les rats supplémentés en méthionine. Lot C (A.40x ;B.100x ; C.400x), lot M (D.40x ;E.400x).(D'après Aggoun *et al.*,2015)

## 1.6- mise en évidence du VEGF-A dans le thymus

Les résultats concernant l'immunohistochimie ont fait l'objet d'une publication dans International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences(ISSN- 0975-1491 2015,7 :234-238). Intitulé :METHIONINE SUPPLEMENTATION INDUCES THYMUS VEGF-A EXPRESSION AND HEMATOLOGICAL CHANGES IN RATS

La détection immunohistochimique du VEGF au sein du tissu thymique, se montre hétérogène entre les deux groupes d'animaux. En effet les thymus contrôles présentent une expression positive de VEGF au niveau corticale ;essentiellement la zone sous capsulaire(figure 30.A, B). Tandis que chez les traités, l'expression du VEGF est localisée dans la médullaire, les septa et les vaisseaux sanguins résidant dans la jonction cortico-médullaire(figure 3. D, E)



**Figure 30:** Expression thymique du VEGF-A. lot C (A.100x ;B .400x), lot M (C.40x ;D.400x ;E.400x).(D'après Aggoun *et al.*,2015)

## **1.7-Effet sur l'expression génique du VEGF-A et de l'HIF1a au niveau aortique**

Pour compléter notre investigation immunohistochimique, nous avons évalué les niveaux d'ARNm de VEGF-A et de l'HIF1a dans l'aorte par la RT-PCR quantitative.

## **2-Résultats relatifs à l'étude *in vitro***

Cette partie est consacrée à examiner l'effet direct de l'Hcy sur le processus angiogénique. D'abord à l'échelle cellulaire, en s'intéressant à ses étapes de développement (prolifération et migration) et en suite à l'échelle moléculaire, en visant deux principaux effecteurs (VEGF-A et OPN).

### **2.1-L'Hcy inhibe l'angiogenèse bourgeonnante**

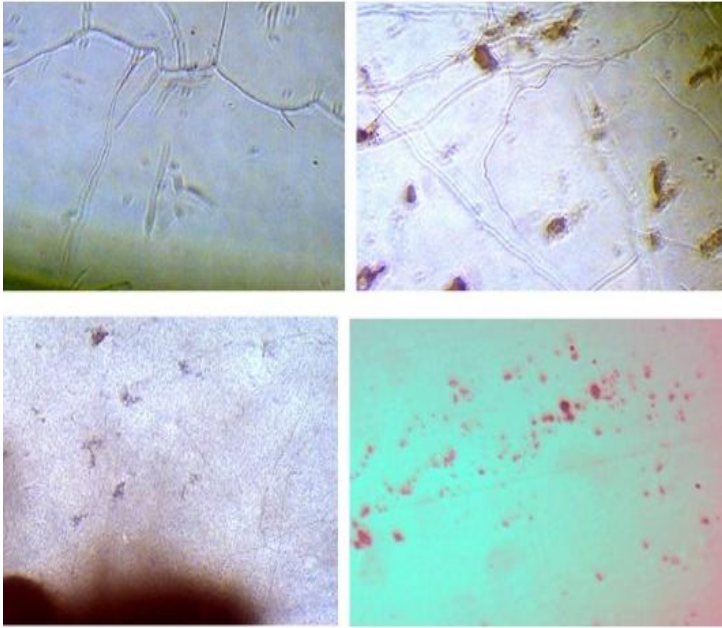
Afin de répondre aux conditions de l'angiogenèse *in vivo* (dégradation de la MEC, prolifération et migration des cellules endothéliales) et pour bien décider du rôle de l'Hcy dans le processus angiogénique. Nous avons procédé par le modèle *ex-vivo* réalisé sur explant de l'aorte, permettant ainsi d'observer et de suivre le phénomène de bourgeonnement vasculaire.

***Au J3*** : L'anneau aortique cultivé dans le milieu témoin bourgeonne de façon importante, formant de nombreuses structures tubulaires (figure 33 A).

***Au J5*** : Le bourgeonnement aortique témoin devient plus dense, les tubes vasculaires ramifiés sont plus longs permettent d'induire des complexes tubulaires continus, fortement ramifiés sur une grande distance tout en restant en contact avec l'anneau aortique; c'est le témoignage d'une prolifération et d'une migration cellulaire pendant la période de culture (figure 33A).

L'Hcy semblerait avoir ici un rôle antiangiogénique qui empêcherait la mise en place et le développement de nouvelles structures vasculaires : les capillaires.





**Figure 33 : Effet de l'Hcy sur le processus de bourgeonnement (40x) .**

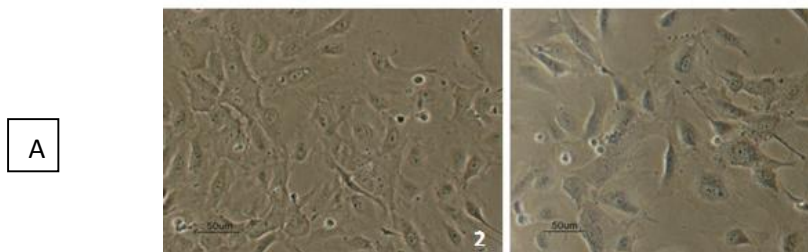
## 2.2-L'homocystéine inhibe la prolifération des HUVECs :

### 2.1.1-Gamme cytotoxique :

Les différentes concentrations d'Hcy ont affecté gravement la morphologie et la capacité proliférative des cellules endothéliales.(figure 34A, B)

Les photomicrographies prises après 24h de traitement révèlent des changements phénotypiques propres à une senescence cellulaire, on note : une augmentation de la taille des cellules et étalement sur leur support, une augmentation de la taille des noyaux et changements dans la structure de lachromatine, et finalement uneaccumulation d'agrégats probablement de nature lipido-protéiques. (figure 34A)

On constate que l'Hcy provoque une cytotoxicité des HUVECs conduisant à une inhibition de la prolifération de type dose dépendante.



**Figure 34:(A). Morphologie cellulaire après 24h d'incubation en présence de différentes concentrations d'Hcy ;**

### **2.1.2-Gamme physiopathologique**

Afin d'évaluer correctement l'impact d'Hcy sur la prolifération des cellules endothéliales, et pour mieux comprendre son mécanisme d'action. Un protocole spécifique a été développé, visant d'abord à exposer les cellules à des concentrations d'Hcy similaires à celles des conditions pathologiques (la culture isolée), et ensuite à refaire la culture en présence d'adénosine (la culture conjuguée)

#### **▪ Résultats relatifs à la culture isolée**

Les concentrations d'Hcy testées ont montré un effet différent sur l'activité proliférative des HUVECs, (figure 35):

à 10  $\mu\text{M}$  (valeur normale d'Hcy chez l'être humain), l'Hcy semble favoriser la prolifération cellulaire.

à 25 et 50  $\mu\text{M}$  (valeurs correspondant à une Hyperhomocystéinémie modérée et intermédiaire), le potentiel antiprolifératif est non significatif voir même absent à 25 micromolaire.

à 100 et 200  $\mu\text{M}$  (valeurs représentant une Hyperhomocystéinémie sévère), l'inhibition est significative.

### **•Résultats relatifs à la culture conjuguée :**

En présence d'Ade (sensibilisation du processus de méthylation), le traitement avec l'homocystéine altère nettement la prolifération des HUVECs0 face au contrôle : Inhibition significative à 25 et 50 $\mu$ M ( $P < 0.05$ ), très significative à 100 $\mu$ M et significative à 200 $\mu$ M

Par rapport à l'analyse de la culture isolée, on constate que le pouvoir antiprolifératif de l'Hcy est potentialisé en présence d'Ade. Essentiellement à 25 et 50 $\mu$ M où on note une réduction de la division cellulaire jusqu'à. Ainsi l'effet inhibiteur de l'homocystéine est dose-dépendant.

### **2.2-L'homocystéine inhibe la migration des HUVECs :**

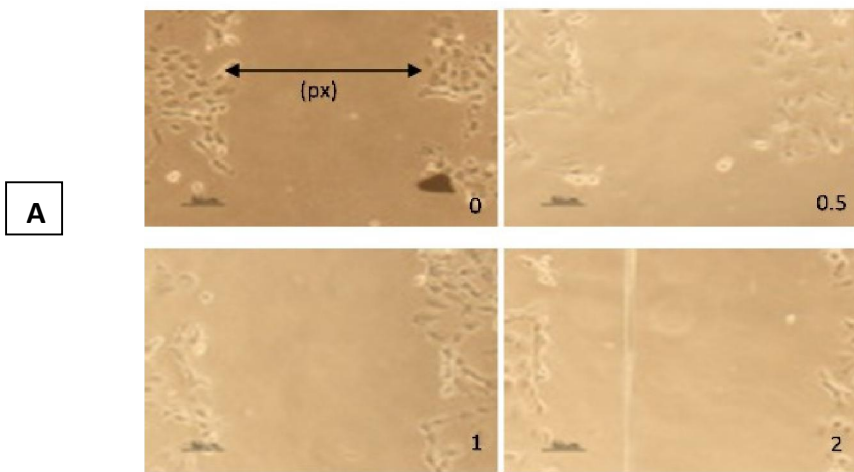
Après avoir étudié l'effet de l'Hcy sur la morphogénèse et la prolifération des HUVEC, nous nous sommes intéressés à son impact sur une autre étape importante de l'angiogénèse : la migration ; grâce à la mise en œuvre d'un test de blessure (*Wound-Healing Assay*).

24 heures après leur mise en culture, les HUVECs forment un tapis cellulaire que l'on « blesse » par grattage pour obtenir une zone acellulaire. Les cellules endothéliales ont tendance à recouvrir la zone acellulaire par migration centripète à partir des 2 bords de la blessure (figure 37A), (figure 39A)

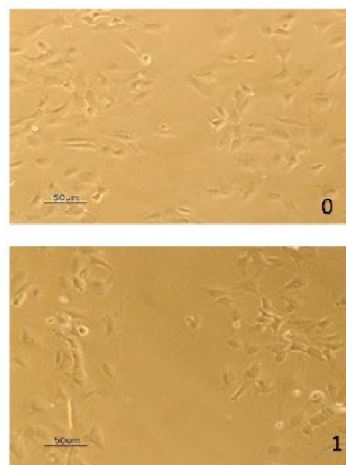
#### **2.2.1-Gamme cytotoxique :**

Les concentrations élevées d'Hcy ont influencé négativement le pouvoir migratoire des cellules endothéliales.

Les photomicrographies correspondantes à  $t=6h$ , montrent une motilité cellulaire dirigée vers l'espace vide reflétant ainsi une polarité respectée, mais cette migration est moins collective en présence d'Hcy précisément à 1 et 2mM (figure 37B). Ces constatations sont confirmées par le test-t qui révèle une inhibition significative de la migration des HUVEC pour ces deux concentrations. (figure 37C)

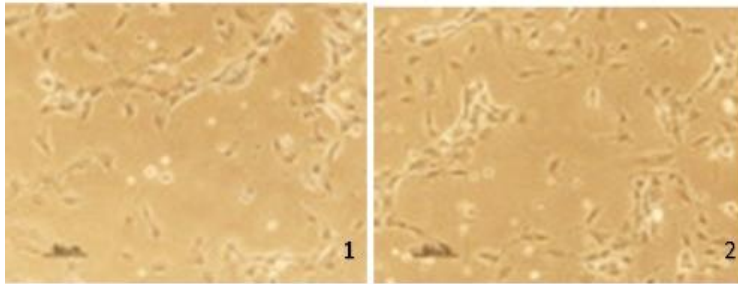


**B**



**Figure 37** :Evaluation de la capacité de migration des CE exposées à différentes concentrations d'Hcy par le test de blessure.(A .40x) :.

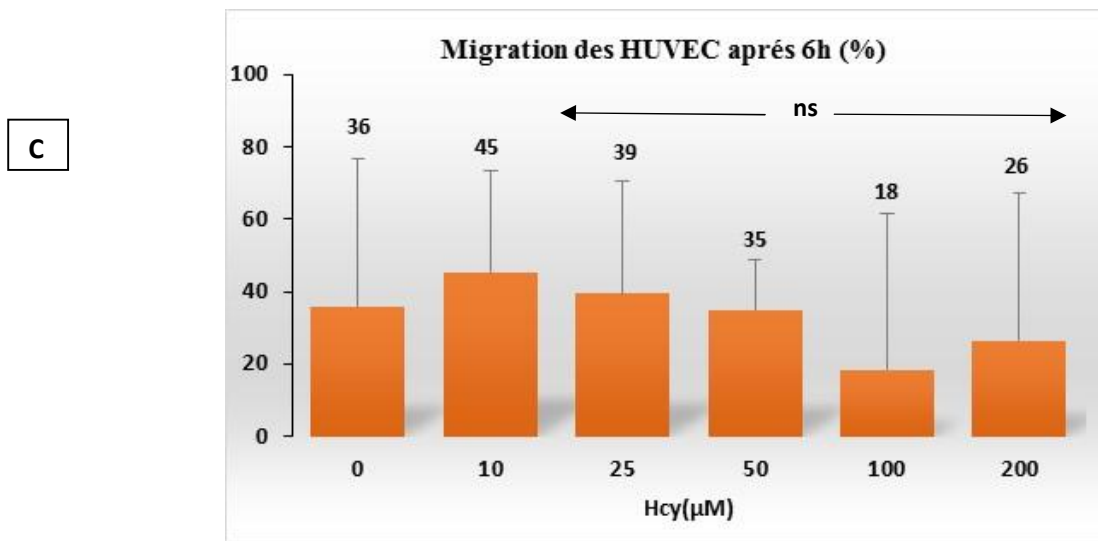
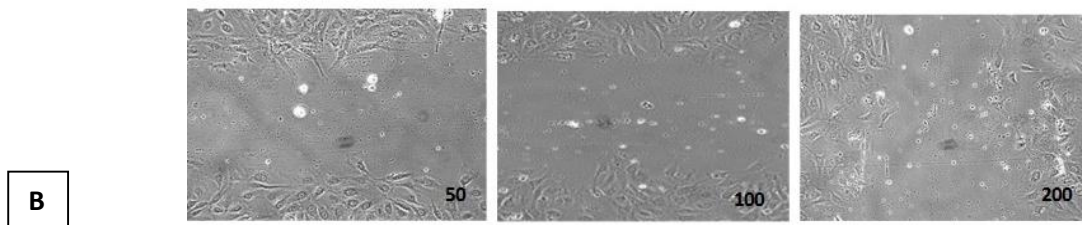
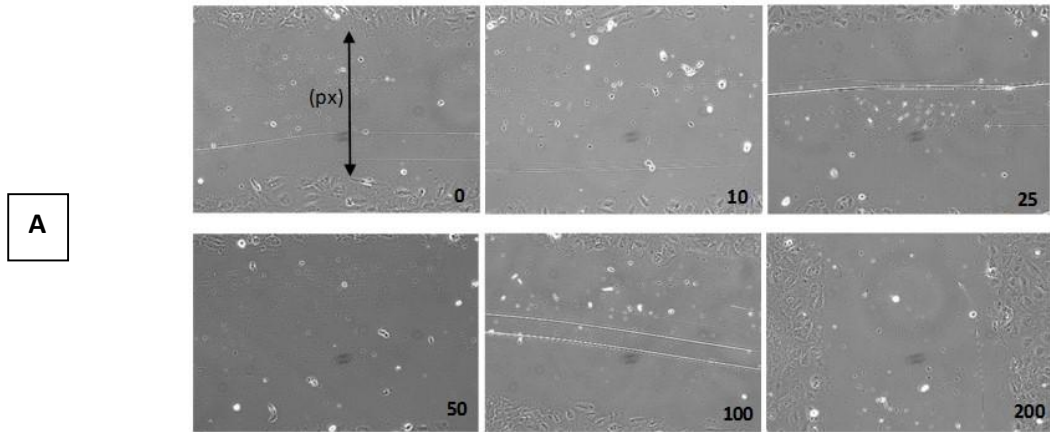
Après 20h de culture, les cellules contrôles se trouvent à nouveau en confluence traduisant ainsi une migration à 100%. Or celles traitées par l'Hcy montrent un champ de migration de plus en plus désorganisé, une masse cellulaire fortement réduite d'un phénotype hétérogène rappelant l'aspect sénescence rencontré dans le test de prolifération (décrit au-dessus) et un profil matriciel pratiquement rompu ce qui peut être attribué à la perte d'adhérence (altération des jonctions intercellulaires).(figure 38)



**Figure 38:** Illustration de la migration des HUVECs après 24 h du traitement par l'Hcy à (0.5, 1 et 2 mM). (40x)

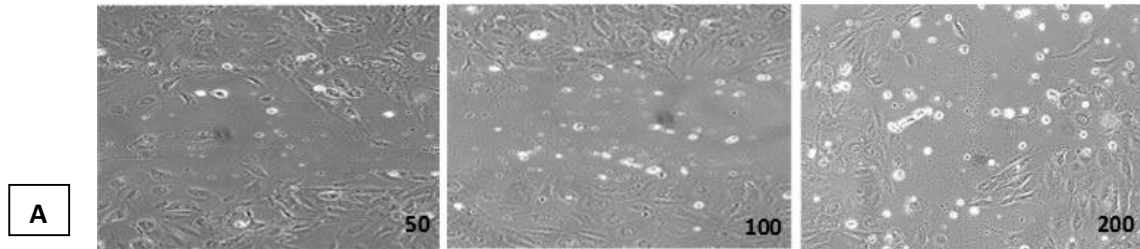
### 2.2.2- Gamme physiopathologique

Six heures après la réalisation de la blessure, les cellules endothéliales contrôles ont recolonisé partiellement la surface dénudée (processus de cicatrisation), tout comme les cellules traitées avec l'Hcy (figure 39B). La quantification de la migration reste non significative par rapport au contrôle (figure 39C).



**Figure39:** Evaluation de la capacité de migration des CE traitées par des concentrations physiopathologiques d'Hcy. (A.40x) : visualisation des blessures à t=0h, (B.40x) : migration des HUVECs à t=6h. (C) : graphique du pourcentage de recouvrement de la blessure normalisée par rapport au contrôle HUVEC .

Au bout de 20h, les HUVECs contrôles recouvrent la totalité de la blessure (tapis confluent). Les cellules endothéliales exposées à l'Hcy présentent par contre un retard important de cette cicatrisation (figure 40A). l'Hcy a montré ainsi un effet anti-migratoire significatif à 25 $\mu$ M, et d'autant plus marqué à 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M et 200 $\mu$ M.(figure 40B).



**Figure 40: (A.40x). Illustration de la recolonisation de la blessure (cicatrisation) après 24h. (B). Graphique des résultats de la quantification statistique de la surface recolonisée normalisés par rapport au contrôle(100%).**



## *Chapitre 4 : Discussion*

Dans la littérature, la supplémentation en méthionine est l'une des méthodes expérimentales adoptées pour produire des modèles d'HH (Gilani *et al.*, 2001 ; Robin *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2015)

Dans notre étude, la supplémentation en méthionine a induit une élévation très significative des taux d'Hcy. Conformément aux études précédentes, nous avons réussi à établir un modèle d'Hyperhomocystéinémie.

Commemarqueurs de l'inflammation, la CRP et les protéines totales se trouvent significativement augmentées dans le groupe M par rapport au contrôle. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux (Meenakshi *et al.*, 2007 ; Ahmed *et al.*, 2011) de plus, il existe une corrélation significative entre la concentration d'Hcy et les paramètres inflammatoires (Da Cunha *et al.*, 2010).

En termes de stress oxydatif, nos résultats ont montré que le MDA hépatique est significativement élevé dans le groupe M. Ceci est en accord avec des études antérieures (Yalçinkaya *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2008), où il a été rapporté que la supplémentation en méthionine modifie le statut antioxydant suite à l'augmentation des niveaux d'homocystéine plasmique. En effet, l'Hcy agit par plusieurs procédés notamment : la génération et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène ou ROS, inhibition du glutathion peroxydase et l'auto-oxydation (Boldyrev *et al.*, 2009 ; Gomez *et al.*, 2011).

Par ailleurs, dans les observations hématologiques les globules rouges, les lymphocytes et les PMN des animaux traités sont apparus avec des anomalies importantes touchant principalement la taille et la morphologie nucléaire. Pour les globules rouges, Nigam *et al.*, (2008) ont rapporté que la consommation excessive de la méthionine provoque des modifications hématologiques comparables aux nôtres : présence de sphérocytes et d'acanthocytes. (figure 26.C)

Récemment, de nombreuses publications ont décrit l'expression de la N-méthyl-D-aspartate (NMDA) dans des cellules immunocompétentes (Mashkina *et al.*, 2010 ; Boldyrev *et al.*, 2012) et également dans les hématies (Makhro *et al.*, 2010). Leur fonction semble être réglementée par les taux plasmatiques d'Hcy et de l'acide homocystéique (dérivé de l'oxydation). Le premier induit une toxicité et des dommages de l'ADN, tandis que le second produit une apoptose cellulaire ; la diminution de la taille des cellules a été observée dans les deux cas (Vladychenskaya *et al.*, 2006 ; Bryushkova *et al.*, 2011).

Ces données corroborent avec nos photomicrographies (figure 26.C, D, E, F). Il est suggéré que l'hyper-activation des récepteurs NMDA provoque une entrée rapide de  $Ca^{2+}$  dans les cellules, associé à une accumulation des ROS et une augmentation de l'incidence de la thrombose qui conduit à des troubles dans les voies de signalisations (Zainullina *et al.*, 2011).

Les résultats histopathologiques de l'aorte est un argument fort du pouvoir angiotoxique de l'Hcy. Les travaux d'Osborne-Pellegrin (1992), de Matthias (1996) et de Kirac (2013) réalisés sur des rats surchargés de méthionine, décrivent des altérations artérielles identiques aux nôtres : des blessures endothéliales avec détachement des CEs et un épaississement de la média (figure 27.C, D). Ceci est dû au dépôt granuleux des protéoglycanes issues de la dégradation de la matrice sous endothéliale, à la dissociation des fibres élastiques, à l'accumulation du collagène et à la présence de cellules spumeuses (CML et Macrophages bourrés de lipides) essentiellement dans l'espace sous- endothélial. De plus les anomalies nucléaires observées au niveau des CML nous rappelle les changements hématologiques décrits précédemment ; l'Hyperhomocystéinémie semble être corrélée au processus d'hypométhylation de l'ADN d'où son endommagement.

En fait, la relation entre l'HH et l'hyperlipidémie est suffisamment prouvée dans la littérature ; l'Hcy induit non seulement l'oxydation de la fraction LDL mais aussi la distribution et le dépôt intra tissulaire de VLDL. Le foie est l'organe le plus sensibilisé par ce déséquilibre car c'est là où siège le métabolisme de la méthionine (Toborek *et al.*, 1996).

Dans la présente étude, le parenchyme hépatique du lot M est envahi par des vésicules lipidiques (figure 28.C) la révélation de cette micro-stéatose nous apporte plus de certitude concernant le potentiel hyperhomocystéinémique du régime adapté. Le processus d'hypométhylation semble être incriminé dans cette anomalie en affectant la synthèse du phosphatidylcholine et par la suite le regroupement des VLDL (Namekata *et al.*, 2004). Recemment, Liu *et al.*, (2010) ont montré chez les souris supplémentées en méthionine, que l'HH a altéré le processus de régénération du foie en inhibant la prolifération des hépatocytes. Ceci est consécutif au stress du reticulum endoplasmique (Yu *et al.*, 2013).

De même, l'examen anatomopathologique du thymus a montré que la supplémentation en méthionine induit des lésions structurelles marquées exprimées par des zones apoptotiques et une atrophie lobulaire (figure 28. D, E). Quaglino *et al.*, (2001) ont rapporté que des

niveaux élevés de ROS associés à une faible concentration de glutathion provoquent l'apoptose des cellules et peuvent contribuer au processus d'involution thymique.

Depuis la découverte des récepteurs NMDA dans les cellules immunocompétentes, de nombreux chercheurs ont décrit les effets apoptotiques de l'Hcy sur les lymphocytes ; ils évoquent l'implication des ROS (Vladychenskaya *et al.*, 2006). En outre l'Hcy peut induire des lésions de l'ADN des lymphocytes par l'intermédiaire d'une altération de la méthylation et des perturbations dans les marqueurs du cycle cellulaire (Picerno *et al.*, 2007). Pour la dilatation des septa, l'Hcy est responsable d'un dysfonctionnement endothélial médié par la méthionine, ceci est largement démontré dans les recherches menées en clinique ou sur des animaux (Peeters *et al.*, 1996, Sharma *et al.*, 2013).

Afin de déterminer si la supplémentation en méthionine provoque une angiogenèse réparatrice dans le thymus, nous avons exploré la localisation du signal VEGF-A par immunohistochimie.

Il a été démontré qu'à la fois la formation et l'organisation du système vasculaire thymique sont VEGF dépendants (Mullur *et al.*, 2005). Plus tard, Andrew *et al.*, (2009, 2012) dans leurs publications, ont confirmé que le développement et la reconstitution de l'endothélium thymique sont réglementés par la production locale du VEGF-A à partir des cellules épithéliales thymiques, ou probablement des thymocytes spécifiques. Ces résultats ne concernent que le thymus de souris nouveau-né mais pas celui de l'adulte. D'autres auteurs ont défini l'association entre la morphogenèse du thymus normal et le vieillissement ; après naissance, les taux de VEGF-A suivent un ordre décroissant (Chinn *et al.*, 2012). Ces données confirment nos résultats dans les thymus contrôles (figure 30.A, B) où l'expression de VEGF-A est localisée essentiellement dans les cellules épithéliales sous-capsulaires.

Cependant, Hyunjoo *et al.*, (2007) ont rapporté que des signaux de VEGF-A ont été détectés dans les cellules épithéliales cytokératine-positives au cours de la régénération thymique, ils ont déduit que cette dernière est accompagnée d'un processus d'angiogenèse réparatrice. Ceci est examiné lors d'une involution aiguë causée par le cyclophosphamide chez le rat adulte.

Cimpeana *et al.*, (2008) ont enregistré les mêmes constatations dans le thymus humain en involution aiguë, mais aussi avec un signal positif dans les vaisseaux sanguins dilatés. Ceci est en accord avec nos observations du lot M; i. e. une expression positive au niveau des septa et des vaisseaux sanguins de la jonction cortico-médullaire (figure 30.C, D, E). Nous

suggérons que le VEGF peut être produit localement suite au déclenchement du processus régénératif résultant de l'involution thymique (confirmée précédemment par l'étude histologique thymique) et /ou véhiculé par la circulation sanguine à la suite d'une dysfonction endothéliale (déjà prouvée par l'étude histologique aortique).

Il est désormais admis que les niveaux plasmatiques du VEGF et son expression sont influencés directement par les changements des taux plasmatiques d'Hcy (Atta *et al.*, 2008 ; Oosterbaan *et al.*, 2012). Ainsi, pour mieux évaluer cette corrélation nous avons investigué par la suite l'effet de l'Hyperhomocystéinémie sur l'expression génique de deux facteurs angiogéniques : VEGF-A et le facteur de transcription hypoxique HIF-1 $\alpha$  dans un modèle vasculaire peu exploré qui est l'aorte.

L'évaluation de l'expression du VEGF en présence d'HH est pratiquée dans différents tissus *in vivo* (Bosch-Marcé *et al.*, 2005) et *in ovo* (Latacha. *et al.*, 2005 ; Oosterbaan *et al.*, 2012). Cependant ces travaux ne dégagent que peu d'informations sur le mécanisme moléculaire de telle interaction. C'est ainsi que nous nous sommes intéressés à explorer le rôle de l'Hcy dans la voie de signalisation du VEGF-A dépendante de l'HIF-1 $\alpha$ . Nos résultats de la qRT-PCR réalisée sur l'aorte ont montré une diminution significative du taux d'ARNm des deux gènes chez le lot M par rapport au lot C.

De nombreuses études ont montré que la régulation de l'expression du VEGF-A est principalement transcriptionnelle. Les facteurs de transcription HIFs sont grandement impliqués dans l'induction du gène VEGF-A. L'hypoxie induit en effet, une augmentation forte et rapide des ARNm et des protéines du VEGF-A mais pas des autres membres de la famille des VEGFs. (Dor *et al.*, 2001). De même, Le système HIF joue un rôle crucial lors de l'angiogenèse. La délétion des gènes codant pour HIF-1 $\alpha$  et HIF-1 $\beta$  provoque une létalité embryonnaire par une diminution de l'expression du VEGF-A, un défaut de développement du système cardiovasculaire et une réduction de la vascularisation de l'embryon et du sac vitellin (Ryan *et al.* 1998 ; Kotch *et al.* 1999 ; Hickey *et al.* 2006).

Récemment, Veeranki *et al.*, (2014) ont révélé sur un modèle d'ischémie de patte des constatations similaires aux nôtres ; ils déclarent que l'HH atténue l'angiogenèse en réduisant le HIF-1 $\alpha$ . Cependant en comparant les deux approches on relève des différences importantes :

-le tissu exploré est la fibre musculaire alors que le nôtre est l'aorte.

-la technique adoptée pour l'évaluation du VEGF-A et HIF-1 $\alpha$  est le western blot donc au niveau protéique, alors que la nôtre est la qRT-PCR donc au niveau de l'expression génique.

Afin d'expliquer le mécanisme propre, ces chercheurs ont soumis l'hypothèse que l'HH en condition d'hypoxie induit une dérégulation de la voie de signalisation Akt/mTOR (*mammalian target of rapamycin*) qui est à l'origine de la prolifération cellulaire (passage en G1), la migration cellulaire, la survie cellulaire, la synthèse protéique et la traduction des facteurs HIF-1 et 2 alpha. En pathologie, cette voie est fortement liée à la tumorigenèse (Guertinet *al.*, 2007).

A ce propos, L'angiogenèse tumorale se décompose en plusieurs étapes incluant la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales sous forme d'un bourgeon capillaire et enfin la morphogenèse capillaire. Chacune de ces étapes peut être mise en évidence par différentes techniques *in vitro* et *in vivo*.

Nous avons réalisé différentes expérimentations en lien avec chacune de ces étapes *in vitro* ; en présence de deux gammes de concentrations d'Hcy : cytotoxique (mM) et physiopathologique ( $\mu$ M).

Dans notre pratique, nous avons décidé tout d'abord d'étudier l'impact de l'Hcy sur l'angiogenèse dans son ensemble via le test de l'explant aortique.

En effet, Lors du bourgeonnement « *sprouting* » il y a activation des CEs, ce qui entraîne une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Puis la migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase proliférative puis d'une différenciation en une structure de type capillaire pour former un réseau vasculaire.

Les constatations fournies par ce test nous ont permis la mise en évidence du potentiel inhibiteur de l'Hcy ; le phénomène de bourgeonnement est fortement réduit voire même absent. Actuellement, il existe une abondante littérature sur ce sujet sauf que la totalité de ces travaux ont fait appel à d'autres méthodes que la nôtre ; citant principalement le test de la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM) et celui du matrigel (tube-formation assay), de plus les concentrations d'Hcy à tester sont extrêmement élevées (10mM, 1mg) par rapport à notre gamme.

Duan *et al.*, (2000) sont les premiers à étudier (*in vivo*) la relation entre l'Hcy et l'angiogenèse, suivis par l'équipe de Nagai *et al.*, (2001) qui a renforcé ce lien en déclarant que l'Hcy inhibe l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*. Cette inhibition semblerait être dose

dépendante ; chose prouvée dans nos résultats et affecterait principalement le remodelage de la matrice extracellulaire et la phase de prolifération des cellules endothéliales (Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002).

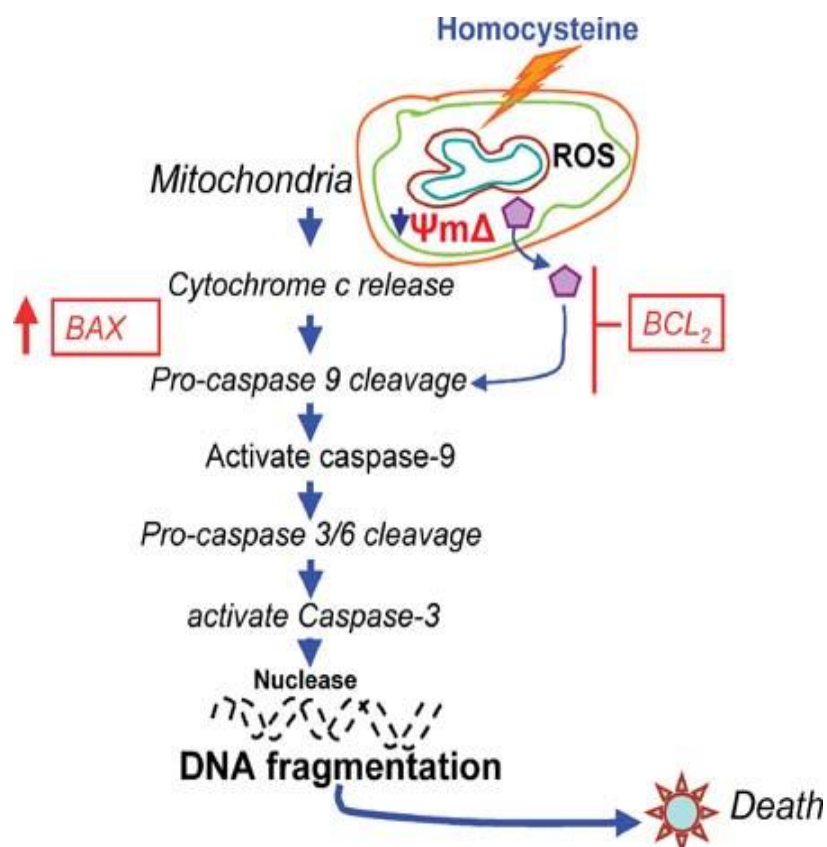
Une perspective intéressante serait ainsi d'investiguer la prolifération des cellules endothéliales qui est une étape clé du processus angiogénique. Nos résultats ont montré que les deux gammes d'Hcy expriment un effet antiprolifératif sur les HUVECs mais d'une manière différente : pour les concentrations cytotoxiques, la relation dose – effet est entièrement dépendante que ce soit à l'échelle qualitative (établissement d'un phénotype sénescence) ou quantitative, contrairement aux concentrations physiopathologiques où elle ne demeure complètement dépendante que dans la culture conjuguée (Hcy et Ade).

Des travaux menés dans ce sens, ont rapporté que l'Hcy a des effets toxiques sur les CEs pouvant induire leur sénescence et leur apoptose (Xu *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2005 et Kam *et al.*, 2012).

Par définition, la sénescence cellulaire correspond à un arrêt de la prolifération irréversible, elle peut être induite prématurément par des signaux oncogéniques ou des dommages dans l'ADN. Alors que l'apoptose est un procédé de mort cellulaire soigneusement régulé et pourrait être la conséquence d'un stress oxydatif, d'une carence en facteurs de croissance, d'anomalies de la transmission des signaux inter et intracellulaires et de modifications du cycle cellulaire (Phelouzat *et al.*, 1995).

Plusieurs mécanismes se joignent pour expliquer le scénario par lequel l'Hcy cause la sénescence et/ou l'apoptose des CEs. L'opinion dominante semble être que l'homocystéine provoque un stress oxydatif dans les cellules en raison de l'auto-oxydation du groupe sulfhydryle, favorisant ainsi la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci est prouvé par des études *in vitro* (Suhara *et al.*, 2004 ; Bao *et al.*, 2009 et Sipkens *et al.*, 2013) dont les résultats sont en grande similarité avec ceux de la gamme cytotoxique.

De même, l'équipe de Tyagi, est l'une des premières à investiguer la relation Hcy-Apoptose des CEs, en apportant une nouvelle conception du mécanisme défini par la triade : Hcy-stress oxydatif- mitochondrie. En bref, l'Hcy par le biais des ROS induit une chute dans le potentiel transmembranaire mitochondrial, suivie par diminution du Bcl2 et augmentation du Bax, ensuite libération du cytochrome C, activation des caspases 9 puis 3 et en fin stimulation des nucléases et fragmentation de l'ADN (Tyagi *et al.*, 2006). Récemment, Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Liu *et al.*, (2013). (figure 43)



**Figure 43** : mécanisme d'activation des caspases par l'homocystéine et mort cellulaire.(D'après Tyagi *et al.*,2006)

En outre, il est désormais admis que l'Hyperhomocystéinémie est intimement liée au processus d'hypométhylation, du fait que l'Hcy peut se combiner à l'adénosine pour former la SAH : principal inhibiteur de la méthyltransférase. Wang *et al.*,(2002), Jamaluddin *et al.*,(2007) ont rapporté que l'Hcy augmente les concentration cellulaire de la SAH et inhibe par la suite la transcription de la cycline A qui s'exprime au cours de la phase S, ce qui nous confirme encore une fois la sénescence des CE en phase G1 du cycle cellulaire. A la lumière de ces données, nous avons développé l'approche de la culture conjuguée (Hcy+ Ade) pour deux objectifs : d'une part, établir une comparaison avec le protocole de la culture isolée et d'autre part, sensibiliser le cycle méthyle de l'Hcy pour s'approcher davantage des conditions *in vivo*, d'autant plus que l'adénosine se trouve dans la totalité des cellules à un taux de 15 $\mu$ M et qui augmente jusqu'à 100 $\mu$ M en cas d'ischémie (Frick *et al.*,1976).

Il ressort de nos résultats, que l'Hcy seul à (25 et 50 $\mu$ M) ne peut pas affecter la prolifération des CE, tandis qu'en présence de l'adénosine (50 $\mu$ M) le mécanisme d'hypométhylation est installé et le pouvoir inhibiteur de l'Hcy se trouve amplifié (jusqu'à 50%) rendant ainsi toutes nos concentrations physiopathologiques sensibles, ainsi la relation



effet- dose retrouvée auparavant dans la gamme cytotoxique est conservée. Nos constatations corroborent avec ceux de Zhang *et al.*,(2012).

Récemment, Zhang *et al.*,(2015) ont examiné la relation Hcy- sénescence et ils ont déduit que l'Hcy accélère la senescence des CEs en provoquant une hypométhylation des télomérases. C'est une enzyme permettant la réparation des télomères et leur maintien à leur longueur initiale et surtout sans elle la tumeur ne peut se développer (Jiang *et al.*,1999). En fait, cette dernière information peut être une perspective prometteuse dans le cadre de thérapie antitumorale autre que la piste d'angiogénèse.

A ce propos, le deuxième processus fondamental pour le développement du vaisseau est la migration des cellules endothéliales. Le test de cicatrice nous a permis d'établir une migration cellulaire collective pour laquelle les cellules maintiennent des contacts cellule-cellule.

Nos résultats montrent que les deux gammes se convergent en terme qualitatif ; révélation de l'effet antimigratoire de l'Hcy, mais se divergent en terme quantitatif ; relation effet-dose et temps. En effet, après 6 heures les concentrations cytotoxiques ont arrivé déjà à inhibé la migration des HUVECs de façon significative et dose-dépendante, contrairement aux concentrations physiopathologiques où on a pu constater cet effet qu'après 20h de traitement.

Nagai et Rodríguez-Nieto ont enregistré les mêmes constatations sur des cellules endothéliales d'aorte de bovin(BAEC) traitées par des doses d'Hcy nettement élevées (1, 5 et 10mM) par rapport à notre gamme cytotoxique (0.5, 1, 2mM). Ils rapportent que le pouvoir antimigratoire de l'Hcy est associé à une régression dans les niveaux d'expression de la métalloprotéine MMP-2 et de l'urokinase (Nagai *et al.*,2001 ; Rodríguez-Nieto *et al.*, 2002).

Plus tard, Shastri *et al.*,(2004) ont confirmé cette relation mais en s'intéressant à d'autres enzymes (MMP-9 et TIMP-1), toutes induisant la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisant l'invasion tumorale (No *et al.*,2009).

De plus Tan *et al.*,(2006) et Zhang *et al.*,(2012) ont investigué le rôle de l'adénosine dans le processus de migration des HUVECs traitées par l'Hcy. Il en découle que l'adénosine potentialise l'effet inhibiteur de l'Hcy et de manière dose- dépendante ; le mécanisme d'hypométhylation est de nouveau incriminé. Ceci est en accord avec nos résultats de la gamme physiopathologique.

En confrontant les résultats de nos deux gammes avec la littérature disponible, on peut déduire que le pouvoir antiangiogénique de l'Hcy à faibles concentrations (<50µM) est médié par le processus d'hypométhylation alors qu'à fortes concentrations (> 100µM) c'est le mécanisme du stress oxydant.

Par ailleurs, la prolifération et la migration des CEs au sein du processus angiogénique sont des phénomènes complexes, résultant de l'action de facteurs pro- et antiangiogéniques activant des voies de signalisation dont la plus efficace est la voie VEGF. Cette dernière se trouve fortement stimulée par certaines molécules de l'environnement tumoral.

En fait, nos résultats *in vivo* ont révélé un effet inhibiteur de l'Hcy sur l'expression du facteur d'hypoxie HIF-1 $\alpha$ , c'est ainsi que nous nous sommes intéressés dans la partie *in vitro* d'abord, à réexaminer l'effet de l'Hcy en concentrations physiopathologiques sur l'expression du VEGF-A et ensuite à explorer son impact sur l'OPN. Le choix de cette dernière molécule est pour deux raisons :

- 1) Actuellement on lui a attribué les propriétés d'une cytokine et un rôle puissant dans l'invasion tumorale (Ramchandani *et al.*, 2015).
- 2) Dans la littérature disponible, pas de travaux associant l'Hcy et l'OPN.

Pour le VEGF-A, Les résultats de la RT-PCR quantitative ont affiché une diminution des taux d'ARNm après 24h de traitement. Cet effet est dose dépendant mais partiellement significatif ( $\geq 100\mu\text{M}$ ).

Les constatations de Shastry *et al.*, (2004) sur les MVECs (brain microvascularendothelial cells) de la souris avec 20µM d'Hcy, de Yan *et al.*, (2010) sur les HUVECs avec (50, 200 et 500µM) d'Hcy et celles de Oosterbaan *et al.*, (2012) sur le modèle CAM avec 50mM d'Hcy thiolactone, vont dans le même sens que les nôtres. Par ailleurs vu leurs procédures, notre étude s'avère beaucoup plus élargie et ciblée du fait qu'on s'est intéressé d'une part à l'Hcy et la CE et d'autre part aux conditions physiologiques et pathologiques.

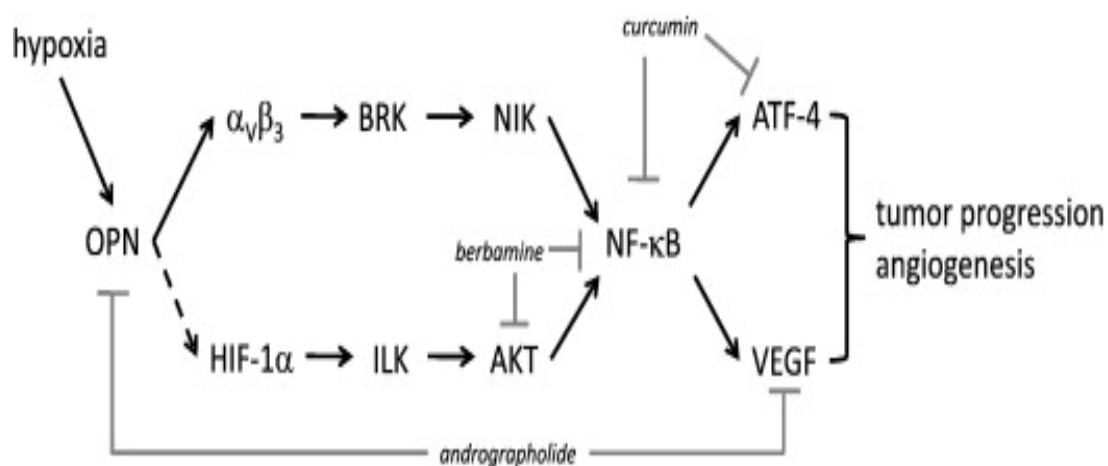
En tentant d'expliquer le mécanisme par lequel l'Hcy affecte l'expression du VEGF, Zhang *et al.*, (2012) ont examiné l'addition de l'adénosine à 50µM d'HCY (condition biologique); il en résulte que l'installation de hauts niveaux de SAH favorise et amplifie l'inhibition du VEGF.

Pour l'OPN, on a soulevé des constatations similaires à celles du VEGF-A. les niveaux d'ARNm sont réduits d'une façon dose- dépendante et partiellement significative ( $\geq 100\mu\text{M}$ ).

Le VEGF et l'OPN se rencontrent dans diverses fonctions physiologiques : motilité cellulaire et angiogenèse, réponse à l'hypoxie et apoptose. Ces effets sont médiés par l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Yue *et al.*, 1994; Liaw *et al.*, 1995). Cependant depuis leurs identifications comme étant des marqueurs de mauvais pronostic dans le cancer (Vergis *et al.*, 2008 ;Cui *et al.*, 2009), les chercheurs se sont intéressés à étudier les modes de communications existant entre les deux.

Au cours de la dernière décennie, Le lien entre l'OPN et le VEGF a été largement discuté, des études ont montré que le VEGF induit l'expression de l'OPN (Liet *et al.*, 2012) alors que dans d'autres c'est l'OPN qui induisait le VEGF(Chakraborty *et al.*, 2008)et leurs voies sont rarement distinctes et indépendantes.Les chercheurs ont établi ainsi les notions de co-expression et de synergie dans les fonctions du VEGF et de l'OPN.

En condition d'hypoxie, le couple OPN-VEGF semble être stimulé par le HIF1- $\alpha$  favorisant ainsi la cascade angiogénique et l'invasion tumorale. (Bosco *et al.*, 2009 ; Wu *et al.*, 2013). Le processus d'activation est médié par la voie de signalisation ILK /AKT / P65 déterminée dans le cancer du sein (Raja *et al.*, 2014) . Dans le cadre thérapeutique de ce cancer, la suppression de l'OPN a induit une régression des taux HIF-1 $\alpha$  et VEGF face à une augmentation de la radiosensibilité des cellules tumorales (Yang *et al.*,2012).



**Figure 44** :Lesvoies de signalisationdans le cancerdu sein.

(D'après Ramchandani *et al.*,2015)

L'OPN favorise la progression de la tumeur et l'angiogénèse à travers deux voies croisées de communication. Toutes deux impliquent l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et l'induction de programmes génétiques spécifiques. Ces voies sont des cibles pour plusieurs candidats médicaments anti-cancéreux.

A la lumière de ces données et tenant compte des objectifs de la problématique de notre thèse, il nous semble difficile de déterminer avec précision le mécanisme d'action de l'Hcy responsable de l'inhibition de l'OPN. Néanmoins nous suggérons deux voies :

- 1) Celle de l'HIF-1 $\alpha$  /VEGF-A avec toute la machinerie de signalisation relativement connue. l'OPN sera ainsi dépendante du VEGF, c'est la voie indirecte.
- 2) Celle de l'OPN/ HIF-1 $\alpha$ , c'est la voie directe et qui semble être une perspective très importante éventuellement dans le cadre thérapeutique si on arrive à concevoir un traitement à base d'Hcy associé à d'autres molécules et à des concentrations bien ajustées.

# *Conclusion*

De nombreux mécanismes d'action ont été décrits pour expliquer l'effet de l'homocystéine sur l'angiogenèse. Les années 2000 ont été celles de la mise en évidence du pouvoir antiangiogénique médié par le stress oxydant et le processus d'hypométhylation ; la CE constituait la cible de choix. Les années 2010 sont celles de la recherche moléculaire impliquée dans les voies de signalisations du VEGF-A ; le microenvironnement tumoral est dans le centre de ces études.

Dans cette optique, nous avons montré *in vivo* que l'Hcy est responsable d'anomalies hématologiques et d'une régénération thymique qui pourraient avoir des conséquences sur le devenir des CEP et éventuellement sur la croissance et l'invasion tumorale où l'Hcy pourrait être un marqueur d'immuno-surveillance.

De même les propriétés inhibitrices affectant la prolifération des CEs, leur migration et l'expression du VEGF-A confèrent à l'Hcy un potentiel de régulation accompagnant le processus angiogénique dans toutes ses étapes. En fait à des concentrations inférieures à 50µM, l'Hcy est susceptible d'induire tous ces effets, ceci est d'un grand intérêt si dans des études plus élargies et approfondies on arrive à garder ces propriétés tout en diminuant les autres effets nuisibles causés par l'Hcy.

Le HIF-1 $\alpha$  et l'OPN jouent un rôle capital dans l'angiogenèse tumorale et l'Hcy semble inhiber l'expression de leurs gènes, Cet aspect est une perspective intéressante pour notre travail et permettra sans doute d'espérer un peu plus en matière de thérapie antiangiogénique en proposant la conception des anticorps Anti-VEGFR ou Anti-OPN conjugués à l'Hcy.

## *Références Bibliographiques*

**Aggoun C., Lamda S and Naimi D.** Methionine supplementation induces VEGF-A expression on thymus in rats. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2015; 7 (2): 234-8.

**Ahmed MA and Elosaily GM.** Role of oxytocin in deceleration of early atherosclerotic inflammatory processes in adult male rats. *Int J Clin Exp Med.* 2011; 4(3):169-78.

**Algire, GH., Chalkley HW., Legallais FY and Park HD.** Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. *J Natl Cancer Inst;* 1945 : 6: 73-85.

**Andersson A., Brattstrom L., Israelsson B., Isaksson A., et al.** Plasma homocysteine before and after methionine loading with regard to age, gender, and menopausal status. *Eur J Clin Invest.* 1992; 22:79-87.

**Andrew RC., Shundi G., Judy Z., Julie J., et al.** VEGF mediated cross-talk within the neonatal murine thymus. *Blood.* 2009; 113: 2723-31.

**Andrew RC., Batul T S., Shundi G., Lisa AK., et al.** Rapid thymic reconstitution following bone marrow transplantation in neonatal mice is VEGF-dependent. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012; 18:683-9.

**Association des enseignants d'immunologie (ASSIM), Société française d'immunologie (SFI).** Méthodes en immunologie des principes aux bonnes applications. **Elsevier / Masson.** 2014 ; p 232.

**Atta HM., El-Rehani MA., Raheim SA and Galal AM.** Lowering homocysteine decreases levels and expression of VEGF(165) and endostatin. *J Surg Res.* 2008 ; 146(2):202-10.

**Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., et al.** Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem.* 2003; 49(1): 32-40.

**Bao XM., Wu CF and Lu GP.** Atorvastatin attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells via inhibiting NADPH oxidase-related oxidative stress-triggered p38MAPK signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2009 ; 30(10):1392-8.

**Benelli R and Albini A.** In vitro models of angiogenesis: the use of Matrigel. *Int J Biol Markers.* 1999; 14(4): 243-6.

**Benjamin L. E., Golijanin D., Itin A., PodeD., et al.** Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 1999; 103(2): 159-65.

**Bergers G and Benjamin LE.** Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6): 401-10.

**Berra E., Benizri E., Ginouves A., Volmat V., et al.** HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1 $\alpha$  in normoxia. *Embo J.* 2003; 22(16): 4082-90.



**Bikfalvi A.** Tumor angiogenesis. *Bull Cancer* .2003; 90(5): 449-58.

**Bosch-Marcé M.,Pola R., Wecker AB., Silver M., et al.** Hyperhomocyst(e)inemia impairs angiogenesis in a murine model of limb ischemia. *Vasc Med*.2005 ; 10(1):15-22.

**Boldyrev AA.** Molecular mechanisms of homocysteine toxicity. *Biochem (Moscow)* 2009; 74(6):589-98.

**Boldyrev AA., Bryushkova EA and Vladychenskaya EA.** NMDA receptors in immune competent cells. *Biochem (Moscow)* 2012; 77(2):128-34.

**BoscoMC., DelfinoS., FerlitoF., PuppoM.,et al.**The hypoxic synovial environment regulates expression of vascular endothelial growth factor and osteopontin in juvenile idiopathic arthritis. *J. Rheumatol.* 2009 ; 36 :1318–1329.

**Brattstrom L., Wilcken DE., Ohrvik J and Brudin L.** Common methylene-tetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinemia but not to vascular disease: the result of a meta-analysis. *Circulation.* 1998; 98:2520-6.

**Bradford M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72 : 248 – 54.

**Bryushkova EA., Vladychenskaya EA., Stepanova MS and Boldyrev AA.** Effect of homocysteine on properties of neutrophils activated in vivo. *Biochem (Moscow)* 2011; 76(4):467-72.

**Burger R.A., Brady M.F., Bookman M.A., Fleming G.F., et al.**Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2011; 365:2473-83.

**Bustin S. A.** Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2000; 25: 169-93.

**Cai Y., Zhang C., Nawa T., Aso T., et al.** Nutri-epigenetics ameliorates blood–brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid, *J. Mol. Neurosci.* 2014 ;52 (2) : 202–15.

**Carmeliet P and Jain RK.** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.*2011; 473 (7347):298-307.

**Carmeliet P and Jain RK.** Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000: 407(6801): 249-57.

**Carmeliet P.** Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003; 9(6): 653-60.

**Castro R., Rivera I., Struys EA., Jansen EE.,et al.** Increased homocysteine and S- adenosyl-homocysteine concentrations and DNA hypomethylation in vascular disease, *Clin. Chem.* 2003; 49 (8) 1292–6.

**Chang C and WerbZ.** The manyfaces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol* .2001; 11(11): 37-43.

**Chang CP., Neilson JR., Bayle JH., Gestwicki JE., et al.** A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis. *Cell*. 2004; 118(5): 649-63.

**Claffey KP., Senger DR and Spiegelman BM.** Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1246(1): 1-9.

**Chakraborty G., Jain S and Kundu GC.** Osteopontin promotes vascular endothelial growth factor-dependent breast tumor growth and angiogenesis via autocrine and paracrine mechanisms. *Cancer Res*. 2008; 68 : 152–61.

**Chappey O., Wautier MP and Wautier JL.** Structure et fonction de l'endothélium. *La revue du Praticien (Paris)*. 1997 ; 2223-6.

**Chavarria T., Sanchez-Jimenez F., Quesada AR and Medina MA.** Homocysteine inhibits the proliferation and invasive potential of HT-1080 human fibrosarcoma cells. *BBRC*. 2003a; 301: 540–4.

**Chavarria T.,Rodriguez-Nieto S., Sanchez-Jimenez F., Quesada AR., et al.** Homocysteine is a potent inhibitor of human tumor cell gelatinases. *BBRC*.2003b; 303: 572–5.

**Chen YT., Meyer CF and Tan TH.** Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1996; 271: 631-4.

**Chinn IK., Blackburn CC., Manley NR and Sempowsk GD.** Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol*. 2012; 24:309-20.

**Chomczynski P and Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*.1987 ;162(1):156-9.

**Cimpeana AM., Raicaa M., Encicab S., Corneac R.,et al.** Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor A (VEGF), and its receptors (VEGFR1, 2) in normal and pathologic conditions of the human thymus. *Ann Anat* .2008; 190:238-45.

**Coussens LM., Tinkle CL., Hanahan D and Werb Z.** MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis. *Cell*. 2000; 103(3): 481-90.

**Cross MJ., Dixelius J., Matsumoto T and Claesson-WelshL.** VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*. 2003; 28(9): 488-94.

**CuiR., TakahashiF., OhashiR., YoshiokaM., et al.** Osteopontin is involved in the formation of malignant pleural effusion in lung cancer. *Lung Cancer*. 2009 ;63 : 368–74.

**Da Cunha AA., Ferreira AGK and Wyse ATS.** Increased inflammatory markers in brain and blood of rats subjected to acute homocysteine administration. *Metab Brain Dis*. 2010; 25:199-206.

**Dai, J., Peng L., Fan K., Wang H., et al.** Osteopontin induces angiogenesis through activation of PI3K/AKT and ERK1/2 in endothelial cells. *Oncogene*. 2009 ; 28 : 3412–22.

**Darland DC and D'Amore PA.** Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2001; 52: 107-49.

**Demuth K., Drunat S., Paul J and Moatti N.** Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *MS*. 2000;16 : 1081-90.

**Dery, MA., Michaud MD and Richard DE.** Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators." *Int J Biochem Cell Biol*. 2005; 37(3): 535-40.

**Devlin AM., Singh R., Wade RE., Innis SM., et al.** Hypermethylation of Fads2 and altered hepatic fatty acid and phospholipid metabolism in mice with hyperhomocysteinemia. *J. Biol. Chem*. 2007 ; 282 (51) :37082–90.

**Djonov V., Baum O and Burri PH.** Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003; 314 (1):107-17.

**Dor Y., Porat R and Keshet E.** Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol* .2001; 280(6): 1367-74.

**Duan J., Murohara T., Ikeda H., Sasaki K., et al.** Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.2000; 20(12):2579-85.

**Dvorak HF., Brown LF., Detmar M and Dvorak AM.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995; 146(5): 1029-39.

**Ehrmann RL and Knoth M.** Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. *J Natl Cancer Inst*. 1968 ; 41, 1329-41.

**Elvert G., Kappel A., Heidenreich R., Englmeier U., et al.** Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha ) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). *J Biol Chem*. (2003). 278(9): 7520-30.

**Escudier B., Pluzanska A., Koralewski P., Ravaud A., et al.** Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007; 370: 2103-11.

**Faller DV.** Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*. 1999 ; 26:74-84.

**Fernandez PM., Tabbara SO., Jacobs LK., Manning FC., et al.** Overexpression of the glucoseregulated stress gene GRP78 in malignant but not benign human breast lesions. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 59(1): 15-26.

**Ferrara N and HenzelWJ.** Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* .1989; 161(2): 851-8.

**Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., DowdM., et al.** Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996; 380(6573); 439-42.

**Ferrara N., Gerber HP and LeCouterJ.** The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9(6): 669-76.

**Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004; 25(4): 581-611.

**Folkman J.** Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*.1971 ; 285 : 1182-6.

**Folkman J.** Proceedings: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res*. 1974; 34(8): 2109-13.

**Folkman J and KlagsbrunM.** Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235(4787): 442-7.

**Folkman J.**Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov*. 2007 ; 6 (4) : 273-86.

**Frick GP and Lowenstein JM.** Studies of 5'-nucleotidase in the perfused rat heart. Including measurements of the enzyme in perfused skeletal muscle and liver. *J Biol Chem*.1976 ; 251(20):6372-8.

**Friedman HS., Prados M.D., Wen P.Y., Mikkelsen T., et al.** Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* .2009; 27 (28): 4733-40.

**Gerhardt H and BetsholtzC.** Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003; 314(1): 15-23.

**Gerber H. P., Dixit V and FerraraN.** Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273(21): 13313-6.

**Gerber H. P., Hillan K. J., Ryan A. M., Kowalski J., et al.** VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* .1999; 126(6): 1149-59.

**Gilani GS., Peace RW and Botting HG.** Effects of folate, vitamin B-12 and vitamin B-6 supplementation on methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *Nut Res*. 2001; 21:1501-7.

**Goel S., Duda DG., Xu L.,Munn LL., et al.**Normalization of the Vasculature for Treatment of Cancer and Other Diseases. *Physiological Reviews*. 2011 ; 91(3):1071-1121.

**Gokul G andKhosla S.** DNA methylation and cancer. *Subcell Biochem*, 2013; 61:597-625.

**Gomez J., Sanchez-Roman I., Gomez A., Sanchez C., et al.**Methionine and homocysteine modulate the rate of ROS generation of isolated mitochondria in vitro. *J Bioenerg Biomembr* 2011; 43(4):377-86.

**Goodwin AM.** In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc Res*. 2007; 74:172–83.

**Gothié E and POUYSSÉGUR J.** HIF-1: régulateur central de l'hypoxie. Médecine/Sciences. 2002 ; 18 (1), 18 janvier.

**Greenblatt M and Shubik P.** Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J Natl Cancer Inst. 1968 ; 41 :111-24.

**Guertin DA and Sabatini DM.** Defining the role of mTOR in cancer. Cancer cell. 2007; 12 (1) : 9-22.

**Harper SJ., Bates DO.** VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?. Nat Rev Cancer. 2008; 8 (11):880-7.

**Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean JW., et al.** Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. 2000; 156 (4):1363-80.

**Hattori K., Dias S., Heissig B., Hackett NR., et al.** Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. J Exp Med. 2001; 193(9): 1005-14.

**Heydrick SJ., Weiss N., Thomas SR., Cap AP., et al.** L-Homocysteine and L-homocystine stereospecifically induce endothelial nitric oxide synthase-dependent lipid peroxidation in endothelial cells. Free Radic Biol Med. 2004 ; 36(5):632-40.

**Hickey MM and Simon MC.** Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. Curr Top Dev Biol. 2006; 76 :217-57.

**Hilmi C., Guyot M and Pages G.** VEGF spliced variants: possible role of antiangiogenesis therapy. J Nucleic Acids. 2012; (2012): ID 162692, 7 pages

**Holzer MP., Solomon KD., Vroman DT., Sandoval HP., et al.,** Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of corneal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(7): 2954-8.

**Huang RF., Hsu YC., Lin HL and Yang FL.** Folate depletion and elevated plasma homocysteine promote oxidative stress in rat livers. J Nutr. 2001; 131: 33-8.

**Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., et al.** Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. 2004; 350(23): 2335-42.

**Hyun-Joo P., Mi NK., Jong-Gab K., Yun-Hee B., et al.** Up-regulation of VEGF expression by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic regeneration in adult rat. Biochem Biophys Acta. 2007; 1773:1462-72.

**Jamaluddin MD., Chen I., Yang F., Jiang X., et al.** Homocysteine inhibits endothelial cell growth via DNA hypomethylation of the cyclin A gene. Blood. 2007 ; 110(10): 3648-55.

**Jain RK.** Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. 2005; 307 (5706):58-62.

**Jain RK., Tomaso Ed., Duda DG., Loeffler JS., et al.** Angiogenesis in brain tumours. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007; 8: 610-622.

**Jiang XR., Jimenez G., Chang E., Frolkis M., et al.** Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet*. 1999 ; 21(1):111-4.

**Jiang Y., Zhang H., Sun T., Wang J., et al.** The comprehensive effects of hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia on pathogenesis of atherosclerosis and DNA hypomethylation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2012 ; 44 (10) : 866–75.

**Jussila L and Alitalo K.** Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*. 2002; 82(3): 673-700.

**Kalani A., Kamat PK., Givvimani S., Brown K., et al.** Nutri-epigenetics Ameliorates Blood–Brain Barrier Damage and Neurodegeneration in Hyperhomocysteinemia: Role of Folic Acid . 2014; 52(2):202-15.

**Kam A., Li KM., Razmovski-Naumovski V., Nammi S., et al.** Combination of TNF- $\alpha$ , homocysteine and adenosine exacerbated cytotoxicity in human cardiovascular and cerebrovascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem*. 2012; 30(3):805-14.

**Kaya M., Wada T., Akatsuka T., Kawaguchi S., et al.** Vascular endothelial growth factor expression in untreated osteosarcoma is predictive of pulmonary metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(2): 572-7.

**Khan SA., Cook AC., Kappil M., Günthert U., et al.** Enhanced cell surface CD44 variant (v6, v9) expression by osteopontin in breast cancer epithelial cells facilitates tumor cell migration: novel post-transcriptional, posttranslational regulation. *Clin. Exp. Metastasis*. 2005; 22 : 663–73.

**Kim DJ., Koh JM., Lee O., Lee YS., et al.** Homocysteine enhances apoptosis in human bone marrow stromal cells. *Bone*. 2006; 39: 582-90.

**Kim SY., Kim H and Min H.** Effects of excessive dietary methionine on oxidative stress and dyslipidemia in chronic ethanol-treated rats. *Nutr Res Pract*. 2015; 9(2):144-9.

**Kirac D., Negis Y and Ozer NK.** Vitamin E attenuates homocysteine and cholesterol induced damage in rat aorta. *Cardiovasc Pathol*. 2013; 22(6):465-72.

**Kotch, LE., Iyer NV., Laughner E and Semenza GL.** Defective vascularization of HIF-1 $\alpha$ -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*. 1999; 209(2): 254-67.

**Kou G., Shi J., Chen L., Zhang D., et al.** Bispecific antibody effectively inhibits tumor growth and metastasis by simultaneous blocking vascular endothelial growth factor A and osteopontin. *Cancer Lett*. 2010; 299(2) : 130–6.

**Latacha K and Rosenquist TH.** Homocysteine inhibits extra-embryonic vascular development in the avian embryo. *Dev Dyn*. 2005; 234 (2):323-31.

- Lawrence de Koning AB., Werstuck GH., Zhou J and Austin RC.** Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clini Biochem.* 2003; 36 (6) : 431–41.
- Lee I., Lee H., Kim JM., Chae EH., et al.** Short-term hyperhomocysteinemia-induced oxidative stress activates retinal glial cells and increases vascular endothelial growth factor expression in rat retina. *Biosci Biotechnol Biochem.*2007; 71(5):1203-10.
- Lee SJ., Kim KM., Namkoong S., Kim CK., et al.** Nitric oxide inhibition of homocysteine-induced human endothelial cell apoptosis by down-regulation of p53-dependent Noxa expression through the formation of S-nitrosohomocysteine. *J Biol Chem.*2005; 280(7):5781-8.
- Lefevre G., Bonneau C., Rahma S., Chanu B., et al.** Determination of plasma protein-bound malondialdehyde by derivative spectrophotometry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.*1996; 34(8):631-6.
- Lefèvre G., Beljean-Leymarie M., Beyerle F., Bonnefont-Rousselot D., et al.** Evaluation de la peroxydation lipidique par le dosage des substances réagissant avec l'acide thiobarbiturique. *Annales Biol Clin* 1998; 56(3):305-19.
- Legrand Y.** Le sang et les vaisseaux. 1987. Hermann (France) P3-29.
- Leung DW., Cachianes G., Kuang WJ., GoeddelDV., et al.** Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* .1989; 246(4935): 1306-9.
- Livak KJ and Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* .2001; 25(4): 402–8.
- LiXD., ChenJ., RuanCC., ZhuDL., et al.** Vascular endothelial growth factorinduced osteopontin expression mediates vascular inflammation and neointima formation via Flt-1 in adventitialfibroblasts, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012; 32 : 2250–58.
- Liaw L., Lindner V., Schwartz SM., Chambers AF., et al.** Osteopontin and beta 3 integrin are coordinately expressed in regenerating endothelium in vivo and stimulate Arg-Gly-Asp-dependent endothelial migration in vitro. *Circ. Res.*1995; 77(4): 665–72.
- Lieber CS and Packer L.** S-adenosylmethionine: molecular, biological and clinicalaspects. An introduction . *Am J Clin Nutr*, 2002; 76(5):1148-50.
- Liu T., Hou DD., Zhao Q., Liu W., et al.** Phytoestrogen  $\alpha$ -Zearalanol attenuates homocysteine-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells.*Biomed Res Int.*2013; (2013):ID 813450, 12 pages
- Liu WH., Zhao YS., Gao SY., Li SD., et al.** Hepatocyte proliferation during liver regeneration is impaired in mice with methionine diet-induced hyperhomocysteinemia. *Am J Pathol.*2010; 177(5):2357-65.
- Lqbal M., Sharma SD., Okazaki Y., Fujisawa M., et al.** Dietary supplementation of curcumin enhances antioxidant and phase II metabolizing perzymes in doly malemia: possible role in protection against chemical carcinogenesis and toxicity. *Pharmacol Toxicol.* 2003; 92(1):33-8.
- Loscalzo J.** The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest.* 1996; 98 (1):5-7.

**Lv J., Shao Q., Wang H., Shi H., et al.** Effects and mechanisms of curcumin and basil polysaccharide on the invasion of SKOV3 cells and dendritic cells. *Mol. Med. Rep.* 2013 ; 8 (5) :1580–6.

**Maeda M., Yamamoto I., Fujio Y and Azuma J.** Homocysteine induces vascular endothelial growth factor expression in differentiated THP-1 macrophages. *BBA* .2003; 1623(1) :41–6.

**Makhro A., Wang J., Vogel J., Boldyrev AA., et al.** Functional NMDA receptors in rat erythrocytes. *Am J Physiol Cell Biol.* 2010; 298 (6):1315-25.

**Mansfield KD., Guzy RD., Pan Y and Young RM .** Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab.* 2005; 1(6): 393-9.

**Mashkina AP., Cizkova D., Vanicky I and Boldyrev AA.** NMDA Receptors are expressed in lymphocytes activated both in vitro and in vivo. *Cell Mol Neurobiol* .2010; 30 (6) :901-7.

**Matthias D., Becker CH., Riezler R and Kindling PH.** Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine *Atherosclerosis*, 1996; 122 (2):201–16.

**McCully KS and Wilson RB.** Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis*. 1975; 22(2): 215-27.

**Meenakshi S., Santosh KR., Manisha T and Ramesh C.** Effect of hyperhomocysteinemia on cardiovascular risk factors and initiation of atherosclerosis in Wistar rats. *Eur J Pharm.* 2007; 574(1):49-60.

**Min H.** Effects of dietary supplementation of high-dose folic acid on biomarkers of methylating reaction in vitamin B(12)-deficient rats, *Nutr. Res. Pract.* 2009 ; 3 (2) : 122–7.

**Mullur SM., Terszowski G., Blum C., Haller C., et al.** Gene targeting of VEGF-A in thymus epithelium disrupts thymus blood vessel architecture. *PNAS* 2005; 102(30):10587-92.

**Nagai Y., Tasaki H., Takatsu H., Nihei S., et al.** Homocysteine inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.*2001 : 281(3):726-31.

**Nagy J. A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., et al.** Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2002; 196(11): 1497-506

**Namekata K., Enokido Y., Ishii I., Nagai Y., et al.** Abnormal Lipid Metabolism in Cystathionine  $\beta$ -Synthase-deficient Mice, an Animal Model for Hyperhomocysteinemia. *JBC.* 2004; 279(51):52961–9.

**Nicosia R and Ottinetti A.** Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta: a quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest.* 1990; 63: 115-22.

**Nigam GK., Ansari MN and Bhandari U.** Effect of rosuvastatin on methionine-induced hyperhomocysteinemia and haematological Changes in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103(3):287-92.



**No JH., Jo H., Kim SH., Park IA., et al.** Expression of MMP-2, MMP-9, and urokinase-type plasminogen activator in cervical intraepithelial neoplasia. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 ;1171:100-4.

**Olivier Laurent.** *Les Rats, De Vecchi,* 2006 ; 94 :10-11.

**Oosterbaan AM., Steegers EA and Ursem NT.** The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development. *Microvasc Res.*2012; 83(2):98-104.

**Osborne-Pellegrin MJ and Fau D.** Effects of chronic absorption of dietary supplements of methionine and cystine on arterial morphology in the rat. *Exp Mol Pathol.* 1992 ; 56(1):49-59.

**Outinen PA., Sood SK., Pfeifer SI., Pamidi Set al.** Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress and growth arrest leads to specific changes in gene expression in human vascular endothelial cells. *Blood.* 1999; 94 (3):959-67.

**Pages G and Pouyssegur J.** Transcriptional regulation of the Vascular Endothelial Growth Factor gene--a concert of activating factors. *Cardiovasc Res.* 2005; 65(3):564-73.

**Papetti M and Herman IM.** Mechanisms of normal and tumor derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002; 282(5): 947-70.

**Park CM., Cho CW., Rosenfeld ME and Song YS.** Methionine supplementation accelerates oxidative stress and nuclear factor  $\kappa$ B activation in livers of C57BL/6 mice. *J Med Food.* 2008; 11(4):667-74.

**Patan S., Haenni B and Burri PH.** Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM):1. Pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res.* 1996; 51(1): 80-98.

**Peeters AC., van der Molen EF., Blom HJ and den Heijer M.** The effect of homocysteine reduction by B-vitamin supplementation on markers of endothelial dysfunction. *Thromb Haemost.*2004; 92(5):1086-91.

**Phelouzat MA., Quadri RA and Proust J J.** Apoptose et sénescence. *médecine/sciences* 1995 ; 11: 894-900.

**Picerno I., Chirico C., Condello S., Visalli G., et al.** Homocysteine induces DNA damage and alterations in proliferative capacity of T-lymphocytes: a model for immunosenescence?. *Biogerontol* 2007; 8 (2):111-9.

**Plouet J., Schilling J and Gospodarowicz D.** Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.* 1989; 8(12): 3801-6.

**Poitras E and Houde A.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology. The Moroccan Society of Biology in Canada* .2002; 2 (2):2-11

**Powis G and Kirkpatrick L.** Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  as a cancer drug target. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(5): 647-54.

**Pries AR and Kuebler WM.** Normal endothelium. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2006; 176:1-40.

**Pritchard KA Jr., Groszek L., Smalley DM., Sessa WC., et al.** Native low density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxidesynthase generation of superoxide anion. *Circ Res.* 1995; 77 (3): 510-8.

**Quaglino D and Ronchetti IP.** Cell death in the rat thymus: a minireview. *Apop.* 2001; 6:389-401.

**Raja R., Kale S., Thorat D., Soundararajan G., et al.** Hypoxia-driven osteopontin contributes to breast tumor growth through modulation of HIF1 $\alpha$ -mediated VEGF-dependent angiogenesis. *Oncogene*, 2014 ; 33(16): 2053–64.

**RamchandaniD and WeberGF.** Interactions between osteopontin and vascular endothelial growth factor : Implications for cancer. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2015 ;1855 (2): 202–22.

**Raymond E., Dahan L., Raoul JL., Bang YJ et al.** Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med.* 2011; 364 (6): 501-13.

**Ribatti D and Vacca A.** Models for studying angiogenesis in vivo. *Int J Biol Markers.* 1999; 14(4): 207-13.

**Rini BI.** VEGF-targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Oncologist* .2005; 10(3): 191-7.

**Robin S., Courderot-Masuyer C., Nicod L., Jacqueson A., et al.** Opposite effect of methionine supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* .2004; 15 (2):80-9.

**Robinson K., Mayer EL., Miller DP., Green R., et al.** Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92 (10):2825-30.

**Rodríguez-Nieto S., Chavarría T., Martínez-Poveda B., Sánchez-Jiménez F., et al.** Anti-angiogenic effects of homocysteine on cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 ; 293(1):497-500.

**Ryan HE., Lo J and JohnsonRS.** HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* .1998; 17(11):. 3005-15.

**Sahni SK.** Endothelial cell infection and hemostasis. *Thromb. Res.* 2007; 119 (5):531-549.

**Sandler A., Gray R., Perry MC., Brahmer J., et al.** Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006; 355 (24): 2542-50.

**Satake S., Kuzuya M., Miura H., AsaiT., et al.,** Up-regulation of vascular endothelial growth factor in response to glucose deprivation. *Biol Cell.* 1998; 90(2): 161-8.

**Selhub J.** Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* .1999; 19:217-46.

**Stipanuk MH.** Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24:539-77.

**Scott JM and Weir DG.** Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk*. 1998; 5(4):223-7.

**Semenza GL and Wang GL.** A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 1992; 12(12):5447-54.

**Senger DR., Galli SJ., Dvorak AM., Perruzzi CA., et al.** Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587): 983-5.

**Senger DR., Galli SJ., Dvorak AM., Perruzzi CA., et al.** A novel mechanism of capillary growth in the rat pulmonary microcirculation. *Anat Rec*. 1990; 228(1): 35-45.

**Sharma P., Kumar J., Garg G., Kumar A., et al.** Detection of altered global DNA methylation in coronary artery disease patients, *DNA Cell Biol*. 2008; 27 (7) :357-65.

**Sharma S., Singh M and Sharma PL.** Mechanism of hyperhomocysteinemia-induced vascular endothelium dysfunction - possible dysregulation of phosphatidylinositol-3-kinase and its downstream phosphoinositide dependent kinase and protein kinase B. *Eur J Pharmacol*. 2013; 721(1-3): 365-72.

**Shastry S and Tyagi SC.** Homocysteine induces metalloproteinase and shedding of beta-1 integrin in microvessel endothelial cells. *J Cell Biochem*. 2004; 93(1):207-13.

**Shastry S., Tyagi N., Hayden MR and Tyagi SC.** Proteomic analysis of homocysteine inhibition of microvascular endothelial cell angiogenesis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004; 50(8):931-7.

**Shevde LA and Samant RS.** Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol*. 2014; 37:131-41.

**Sie KK., Li J., Ly A., Sohn KJ., et al.** Effect of maternal and postweaning folic acid supplementation on global and gene-specific DNA methylation in the liver of the rat offspring, *Mol. Nutr. Food Res*. 2013; 57 (4) : 677-85.

**Sipkens JA., Hahn N., van den Brand CS., Meischl C., et al.** Homocysteine-induced apoptosis in endothelial cells coincides with nuclear NOX2 and peri-nuclear NOX4 activity. *Cell Biochem Biophys*. 2013; 67(2):341-52.

**Song F., Smith JF., Kimura MT., Morrow AD., et al.** Associations of tissue-specific differentially methylated regions with differential gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:3336-41.

**Staton CA., Stribbling SM., Tazzyman S., Hughes R., et al.** Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*, 2004; 85(5): 233-48.

**Suhara T., Fukuo K., Yasuda O., Tsubakimoto Met al.** Homocysteine enhances endothelial apoptosis via upregulation of Fas-mediated pathways. *Hypertension*. 2004; 43(6):1208-13.

**Suri C., McClain J., Thurston G., McDonald DM., et al.** Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998; 282(5388): 468-71.

**Takagi H., King G. L., Robinson G. S., Ferrara N., et al.** Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996; 37(11): 2165-76.

**Takahashi Y., Takahashi S., Shiga Y., Yoshimi T., et al.,** "Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem.* 2000; 275(19):14139-46.

**Tan H., Jiang X., Yang F., Li Z., et al.** Hyperhomocysteinemia inhibits post-injury reendothelialization in mice. *Cardiovasc Res.* 2006 ; 69(1):253-62.

**Taraboletti G and Giavazzi R.** Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2004; 40(6): 881-9.

**Terman BI., Carrion M. E., Kovacs E., Rasmussen BA., et al.** Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene.* 1991; 6(9): 1677-83.

**Thomas GV., Tran C., Mellinghoff IK., Welsbie DS., et al.** Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat Med.* 2006; 12: 122-7.

**Toborek M., kopieczna-grzebieniak E., drozd M and wieczorek M.** increased lipid peroxydation and antioxydant activity in methionine induced hepatitis in rabbit. *Nutrition.* 1996; 12(7-8):534-7.

**Tsang VC., Hancock K and Maddison SE.** Quantitative Capacities of Glutaraldehyde and Sodium m-Periodate Coupled Peroxidase-Anti-Human IgG Conjugates in Enzyme-Linked Immunoassays. *Journal of Immunological Methods.* 1984; 70: 91 – 100.

**Tyagi N., Ovechkin AV., Lominadze D and Tyagi SC.** Mitochondrial mechanism of microvascular endothelial cells apoptosis in hyperhomocysteinemia. *J Cell Biochem.* 2006; 98:1150-62.

**Ueland PM., Refsum H., Stabler SP., Malinow MR., et al.** Total homocysteine in plasma or serum : methods and clinical applications. *Clin Chem.* 1993; 39 : 1764 - 79.

**Unemori, EN., Ferrara N., Bauer EA and Amento EP.** Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1992; 153(3): 557-62.

**Upchurch GR, Jr., Welch GN., Fabian AJ., Freedman JE., et al.** Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem.* 1997; 272:17012-7.

**Urano F., Wang X., Bertolotti A., Zhang Y., et al.** Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000; 287: 664-6.

**Van Cutsem E., Tabernero J., Lakomy R., Prenen H., et al.** 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. *J Clin Oncol.* 2012; 30 :3499-3506.

**Vargas A., Zeisser-Labouèbe M., Lange N., Gurny R., et al.** The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(11):1162-76.

- Veeranki S., Givvimani S., Pushpakumar S and Tyagi SC.** Hyperhomocysteinemia attenuates angiogenesis through reduction of HIF-1 $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  levels in muscle fibers during hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*2014; 306(8):1116-27.
- VergisR., CorbishleyCM., NormanAR., BartlettJ., et al.**Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study, *Lancet Oncol.*2008;9 : 342–51.
- Vladychenskaya EA., Tyulina OV and Boldyrev AA.**Effect of homocysteine and homocysteic acid on glutamate receptors on rat lymphocytes. *Bull Exp Biol Med* 2006; 142(7):55-8.
- Wang Hong., Jiang XH., Yang F., Chapman GB., et al.** Cyclin A transcriptional suppression is the major mechanism mediating homocysteine-induced endothelial cell growth inhibition. *Blood.* 2002; 99:939-45.
- Wang H., Yoshizumi M., Lai K., Tsai J.C., et al.**Inhibition of growth and p21ras methylation in vascular endothelial cells by homocysteine but not cysteine, *J. Biol. Chem.* 1997;272: 25380–5.
- Woolard J., Bevan HS., Harper SJ and Bates DO.** Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation.* 2009; 16 (7):572-92.
- WuC., ZhouY., Chang J and XiaoY.** Delivery of dimethyloxallyl glycine in mesoporous bioactive glass scaffolds to improve angiogenesis and osteogenesis of human bone marrow stromal cells, *Acta Biomater.* 2013; 9 : 9159–68.
- Xu D ., Neville R and Finkel T.** Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett.*2000 ; 470(1):20-4.
- Yalçinkaya S., Ünlücerci Y and Uysal M.** Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2007; 58:455-9.
- Yan TT., Li Q., Zhang XH., Wu WK.,et al.**Homocysteine impaired endothelial function through compromised vascular endothelial growth factor/Akt/endothelial nitric oxide synthase signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*2010; 37(11):1071-7.
- Yang L., Zhao W., Zuo WS., Wei L., et al.,** Silencing of osteopontin promotes the radiosensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor *Chin. Med. J. (Engl.).* 2012 ; 125 : 293–9.
- Yoshiji H., Gomez DE., Shibuya M and ThorgeirssonUP.** Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 1996; 56(9):2013-6.
- Yu X., Lv J., Zhu Y., Duan L., et al.** Homocysteine inhibits hepatocyte proliferation via endoplasmic reticulum stress. *PLoS One.*2013; 8(1):e54265.
- Yue TL., McKenna PJ., Ohlstein EH., Farach-Carson MC., et al.** Osteopontin-stimulated vascular smooth muscle cell migration is mediated by beta 3 integrin. *Exp. Cell Res.* 1994; 214: 459–64.

- Zainullina LF., Yamidanov RS., Vakhitov VA and Vakhitova YV.** NMDA receptors as a possible component of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry in human T-lymphocytes. *Biochem (Moscow)* 2011; 76(11):1220-6.
- Zhang C., Cai Y., Adachi MT., Oshiro S., et al.** Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* . 2001; 276: 35867-74.
- Zhang L., Yu D., Hu M., Xiong S., et al.** Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res.* 2000; 60(13): 3655-61.
- Zhang Q., Li Q., Chen Y., Huang X., et al.** Homocysteine-impaired angiogenesis is associated with VEGF/VEGFR inhibition. *Front Biosci (Elite Ed)*.2012; 1(4) :2525-35.
- Zhang D., Sun X., Liu J., Xie X., et al.** Homocysteine accelerates senescence of endothelial cells via DNA hypomethylation of human telomerase reverse transcriptase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2015; 35(1):71-8.
- Zhao H., Kalivendi S., Zhang H., Joseph J., et al.** Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:1359-68.

**Résumé : Effets de l'homocystéine sur les processus angiogéniques et l'invasion tumorale du tissu endothélial dans un modèle animal.**

**AGGOUN CHERIFA**

---

L'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants elle est rencontrée dans de nombreuses situations physiopathologiques, notamment dans la tumorigenèse. L'activation de la cellule endothéliale (CE) par le VEGF-A est l'étape décisive du processus. Etant donné que l'homocystéine (Hcy) est doté d'un pouvoir angiotoxique, l'objectif de ce travail est d'évaluer en deux études (*in vivo* et *in vitro*) l'effet de cette molécule sur l'angiogenèse et l'invasion tumorale en impliquant le VEGF et deux puissants effecteurs de sa signalisation : le HIF (hypoxia –inducible factor)-1 $\alpha$  et l'OPN (Ostéopontine).

Dans l'étude *in vivo*, après avoir confirmé la conception de notre modèle d'Hyperhomocystéinémie (HH) par les études biochimiques (Hcy total, protéines totales, CRP et MDA) et histologiques (Aorte, Foie et Thymus), nous avons montré que l'HH a potentialisé la présence du VEGF-A au niveau thymique traduisant ainsi l'installation d'une angiogenèse réparatrice, parallèlement à une inhibition de l'expression génique du couple VEGF-A et HIF-1 $\alpha$  au niveau aortique.

Dans l'étude *in vitro*, nous avons évalué de près l'effet antiangiogénique de l'Hcy précédemment révélé *in vivo*, en exposant les HUVECs à des concentrations cytotoxiques et physiopathologiques. En effet, la première gamme a révélé une forte inhibition de la prolifération, de la migration et du bourgeonnement capillaire associée à une sénescence et une apoptose des CEs. Dans la gamme physiopathologique, l'inhibition est toujours dose – dépendante mais elle est partiellement significative ( $\leq 100\mu\text{M}$ ). À la réalisation de la culture conjuguée (Hcy + Adénosine), la significativité est devenue complète ( $\geq 50\mu\text{M}$ ). Ceci nous a permis de mettre en évidence le mécanisme d'hypométhylation imposé par l'Hcy. De même, à l'échelle moléculaire l'Hcy a inhibé l'expression génique du VEGF-A et de l'OPN.

L'ensemble de notre travail montre un nouvel aspect du pouvoir antiangiogénique de l'Hcy, en modulant l'expression des gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale.

**Mots clés : Homocystéine, Angiogenèse, Invasion tumorale, VEGF-A, Voies de signalisation, Rat, HUVECs.**

**Summary: Effects of Homocysteine on angiogenic processes and tumor invasion of endothelial tissue *in vivo* and *in vitro*.**

**AGGOUN CHERIFA**

---

Angiogenesis is the formation of new blood vessels from pre-existing vessels, existing in many pathophysiological conditions, including tumorigenesis. In the activation of the endothelial cell (EC), VEGF-A (vascular endothelial growth factor) is the decisive stage of the process. Since homocysteine (Hcy) has an angiotoxic power, the aim of this work is to assess (*in vivo* and *in vitro* studies) the effect of this molecule on angiogenesis and tumor invasion involving VEGF and its two powerful signaling effectors: the HIF (hypoxia-inducible factor) -1 $\alpha$  and the OPN (Osteopontin).

In the *in vivo* study, the conception of our Hyperhomocysteinemia model (HH) is confirmed by biochemical study (total Hcy, total protein, CRP and MDA) and histological one (aorta, liver and thymus). We showed that HH potentiated the presence of VEGF-A in thymus, suggesting the installation of a reparative angiogenesis effect, in the same time to an inhibition of VEGF-A and HIF-1 $\alpha$  expressions in aortic tissue.

In the *in vitro* study, we evaluated the antiangiogenic effect of Hcy previously revealed *in vivo*, by exposing HUVECs to cytotoxic and pathophysiological concentrations of Hcy. In fact, the first range revealed a strong inhibition of the proliferation, migration and capillary sprouting associated with senescence and apoptosis of EC. In pathophysiological range, inhibition is always dose-dependent and became completely significant in adenosine condition. Hcy seems to act by an hypomethylation mechanism. In addition, the results of qRT-PCR revealed that Hcy inhibited gene expression of VEGF-A and OPN in dose-dependent manner. This study shows a new aspect of antiangiogenic properties of Hcy, by impaired the expression of genes involved in tumor angiogenesis.

**Key- words : Homocysteine, Angiogenesis, Tumor invasion, VEGF-A, Signaling pathways Rat, HUVEC**