



Année 2012

Thèse n°4621

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement

Le 15 Novembre 2012

Par Prisca Exertier

Née le 23 Décembre 1986 au Lamentin

Rôle des kinésines mitotiques Eg5 et MKLP-2 dans l'angiogenèse physiologique et pathologique

Membres du Jury

Mme Cécile Duplâa, Directeur de Recherche Inserm

Mr Yves Audigier, Directeur de Recherche CNRS

Mr John De Vos, Maître de Conférences

Mr Martin Hagedorn, Maître de Conférences, Université de Bordeaux 1

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Rôle des kinésines mitotiques Eg5 et MKLP-2 dans l'angiogenèse physiologique et pathologique.

L'angiogenèse est un phénomène biologique complexe qui décrit la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus essentiel est régulé par des nombreux facteurs, dont le plus puissant est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF). Des inhibiteurs du VEGF sont actuellement utilisés dans le traitement de nombreux cancers solides. Leur efficacité est constatée dans plusieurs études mais des résistances contre ces molécules sont fréquemment observées. Afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans la voie de signalisation de VEGF, nous avons utilisé le modèle de la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. Les CAM traitées par le VEGF développent de nombreux vaisseaux après 24h de traitement. Ces tissus ont été isolés pour effectuer une analyse transcriptomique. En dehors des gènes endothéliaux déjà connus pour être régulés par le VEGF, de nombreux nouveaux gènes ont été identifiés. Nous avons focalisé notre recherche sur des gènes codant pour les kinésines mitotiques KIF11/Eg5 et KIF20A/MKLP-2 qui ont été très fortement induites.

Nous avons démontré que KIF11 et KIF20A sont fortement exprimées au niveau de l'endothélium dans des tissus sains comme dans des cancers solides. KIF20A est impliquée dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro*. Nous avons montré que des inhibiteurs chimiques spécifiques de KIF11/Eg5 (DMN et ISP) bloquent les étapes clés de la formation des vaisseaux sanguins (prolifération, adhérence et migration des cellules endothéliales) et la prolifération des cellules tumorales (gliomes et cancer rénal). De plus, sur la CAM et chez la souris, l'inhibition de cette même kinésine diminue significativement la croissance et la vascularisation des modèles tumoraux utilisés lors de ce projet (le glioblastome et le carcinome rénal). En conclusion, Eg5 et MKLP-2 pourraient des cibles potentielles dans les thérapies anti-angiogéniques.

Mots clés : Eg5, MKLP-2, angiogenèse, kinésine, ispinesib, dimethylenastron, glioblastome, cancer rénal

Role of the mitotic kinesins Eg5 and MKLP-2 in physiologic and pathologic angiogenesis.

Angiogenesis is a complex biological phenomenon which describes the formation of new blood vessels from pre-existing vessels. This process is regulated by a plethora of different molecules with vascular endothelial growth factor (VEGF) being one of the most important ones. VEGF inhibitors are currently used in the treatment of numerous solid cancers. Even though the efficacy of such treatment is proven by numerous studies, resistance to anti-angiogenic therapy is a common feature. To identify new therapeutic targets downstream of VEGF, we modeled its action on the chick chorioallantoic membrane (CAM). VEGF-treated CAMs develop a dense vascular network 24h after application. We used chick microarrays to monitor global gene expression changes in VEGF-induced CAMs. Beside a consistent number of genes already described to be regulated by VEGF, numerous unknown genes have been identified. We have focused our work on the characterization of Eg5/KIF11 and MKLP-2/KIF20A, members of the kinesin family, both strongly upregulated by VEGF.

We demonstrated that Eg5 and MKLP-2 are strongly expressed by blood vessels in normal and cancer tissue sections. KIF20A is involved in the proliferation and migration of endothelial cells *in vitro*. We showed that chemical inhibitors specific for KIF11/Eg5 (DMN and ISP) affect key steps in the formation of blood vessels (proliferation, adhesion and migration of endothelial cells) and proliferation of tumor cells (glioma and renal cancer). Furthermore, in experimental glioblastoma and renal cell carcinoma models (CAM and orthotopic implantation in mice), anti-Eg5 treatment strongly reduces tumor angiogenesis and growth. In conclusion, Eg5 and MKLP-2 could be potential targets in anti-angiogenic therapies.

Keywords: Eg5, MKLP-2, angiogenesis, kinesin, ispinesib, dimethylenastron, glioblastoma, renal cell cancer

Pour ma mère et ma sœur...

Pou manman mwen é sè mwen,

Pou zot, mwen tchimbé raid,

Pou zot, mwen pa moli

Merci à toi Yann, pour ton soutien et tes encouragements au cours de ces années. Grâce à toi, cette thèse n'a pas été une épreuve, mais une conquête.

Remerciements

Je remercie Martin Hagedorn pour m'avoir choisie pour mener à bien ce projet intéressant et enrichissant et pour la confiance qu'il m'a accordée. Merci pour tous ces encouragements au cours de ma thèse.

Je remercie Andréas Bikfalvi de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et pour les mois qu'il m'a accordés pour finir mon projet.

Je remercie le Dr. John De Vos d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en qualité d'examineur et de président de jury. Je remercie également les rapporteurs de ma thèse, le Dr. Cécile Duplâa et en particulier le Dr. Yves Audigier qui a grandement contribué à la correction du manuscrit.

Je tiens à remercier Sophie Javerzat pour m'avoir permise de travailler sur un autre projet et pour ses conseils au cours de ma thèse.

Je remercie tous ceux que l'on appelle les « chefs du labo ». Un grand merci à toi Clotilde, pour ton aide et ta gentillesse à toute épreuve. Patrick pour toutes ces discussions trop marrantes qui m'ont changé les idées et ta super commande de cellules de truites à 12 000 euros qui nous aura bien fait rire! Sophie pour son humour et Michel pour sa gentillesse.

Je remercie Raphaël Pineau et son équipe pour tout le temps qu'ils ont consacré au projet. Merci pour tout Raphaël, j'ai apprécié être ton assistante de chirurgie, même si c'est un boulot plutôt stressant. Je remercie en particulier Benjamin et Marie-Paule pour toutes ces injections faites aux souris.

Maylis, merci de m'avoir encadrée les premiers mois de ma thèse. Tes phrases qui commencent par « j'ai une question pourrie... » me manqueront ☺!

Un grand merci aux copains du labo pour toutes ces barres de rire, les soirées Pizza Ciné et autres et surtout pour le soutien et l'amitié qu'ils m'ont témoigné pendant ma thèse.

Nadège, avec qui j'ai partagé tant de choses, du McDo aux séances de sport avancées. Merci pour m'avoir expliquée comment chouchouter les HUVEC et pour m'avoir proposée ton aide quand tu voyais que j'étais un peu surmenée. Arnaud, merci pour ton soutien et nos discussions scientifiques. Tu m'auras appris tant de choses. Sylvaine, merci pour tes conseils administratifs et scientifiques et pour tous ces week-ends au labo que nous avons partagés. J'espère voir ta terrasse avant de partir! Babou, avant de te rencontrer, je ne savais pas que l'être humain pouvait survivre en se nourrissant de bonbons, chocolats et coca!! Merci de m'avoir montré comment cultiver des anneaux aortiques trop grands pour être photographiés et aussi pour les rétines. Oui-oui, j'espère un jour te revoir dans ta magnifique robe mais je ne te remercie pas pour avoir effacé à deux reprises ma thèse! MIMOLETTE, bon courage pour cette dernière année de thèse.

Céline, merci d'avoir répondu présente pour me montrer la migration sur gel d'agarose et merci de m'accueillir tous les matins avec un grand sourire !

Je remercie Fabienne et Cathy pour leurs conseils aussi bien sur les demandes de financement que sur les manips.

Jess, tu auras changé mes week-ends au labo : Merci de m'avoir montrée (malheureusement ma dernière année) que la porte du bâtiment s'ouvre avec notre clé !!!

Je remercie Marie Claude, pour sa gentillesse et son aide. Annie et Fred, merci pour toutes ces commandes passées et désolée pour les codes nomenclature. Je remercie aussi Karine, qui s'est occupée de mon dossier depuis la signature de mon contrat jusqu'aux demandes de vacation pour finir le projet.

Je remercie les étudiants que j'ai encadrés pour leur contribution à ce projet : Pascal Bardeau, Marion Constantin, Aurélia Coronas, Guillermo Rosano et Marine Labat.

Je n'oublie pas les membres de l'équipe 2, qui m'ont montré le modèle du poisson zèbre.

Je tiens à remercier Vincent Pitard et Santiago Gomez pour leur aide et leurs conseils en cytométrie de flux. Et encore désolée pour la blouse...

Je n'oublie pas l'équipe qui m'a encadrée et soutenue en Master pour que je fasse une thèse, Anne-Emilie Allain, Pascal Branchereau, Pierre Meyrand et William Cazenave. Merci d'avoir cru en moi.

Sommaire

Liste des illustrations.....	13
Abréviations	15
Introduction	17
I. Le développement du système vasculaire chez les vertébrés.....	19
1) Aspects anatomiques et physiologiques	19
2) La mise en place du système vasculaire	21
3) L'angiogenèse.....	24
4) Modèles pour étudier l'angiogenèse physiologique	34
II. L'angiogenèse tumorale	44
1) Mécanismes de l'angiogenèse tumorale	45
2) Le glioblastome	49
3) Le carcinome rénal à cellules claires.....	54
4) Mécanismes de résistance aux thérapies angiogéniques	59
III. Les kinésines.....	61
1) Moteurs moléculaires	61
2) Structure des kinésines	62
3) Fonctions des kinésines	65
4) Rôle des kinésines dans le cancer.....	77
4.1) Eg5	78
4.2) KIF20A/MKLP-2	85
5) D'autres fonctions pour les kinésines mitotiques	87
IV. PROJET DE RECHERCHE	89
Les tests <i>in vitro</i>	93
1) Cellules primaires et lignées.....	93
2) Test de prolifération.....	94
3) Test d'apoptose.....	94
4) La migration	95
5) Test d'adhérence.....	95
6) La tubulogenèse	95
7) Cytométrie de flux	97
La quantification des protéines : le Western blot et les puces à anticorps	97
1) Préparation des échantillons	97
2) Western blot.....	98
3) Les puces à anticorps	99
Modèles d'étude <i>ex vivo</i>	100
1) La culture d'anneaux aortiques.....	100

Modèles d'étude <i>in vivo</i>	100
1) Le glioblastome sur la CAM	100
2) Xénogreffe de cellules cancéreuses chez la souris immunodéficiente	103
2.1) Injection intra-crâniale des cellules de glioblastome.	103
2.2) Le carcinome rénal	104
Quantifications et analyses statistiques	106
Résultats discutés.....	109
I. Rôle des kinésines mitotiques dans l'angiogenèse physiologique.....	111
1) Expression et caractérisation des kinésines mitotiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	111
1.1) La kinésine mitotique KIF11/Eg5/KSP.....	111
1.2) La kinésine mitotique KIF20A/MKLP-2	113
2) L'inhibition chimique des kinésines réduit l'angiogenèse <i>in vitro</i>	115
2.1) L'inhibition chimique des kinésines bloque la prolifération et induit l'apoptose....	115
2.2) Le blocage chimique d'Eg5 et MKLP-2 inhibe l'angiogenèse <i>in vitro</i>	121
2.3) L'inhibition chimique des kinésines Eg5 par le l'ispinesib et le paprotrain réduit la formation de néovaisseaux dans des cultures d'anneaux aortiques.....	126
II. Rôle de la kinésine Eg5 dans l'angiogenèse tumorale	129
1) Le glioblastome	129
1.1) L'inhibition chimique d'Eg5 par le DMN et l'ispinesib réduit la vascularisation du glioblastome expérimental.....	129
1.2) Effet du traitement ispinésib sur la vascularisation et la croissance des glioblastomes.	131
2) Le carcinome rénal	134
2.1) La kinésine Eg5 dans les cellules Renca.....	134
2.2) L'ispinesib inhibe la croissance des tumeurs Renca	135
2.3) Le SB-743921 inhibe la vascularisation des tumeurs Renca	138
Conclusion générale et perspectives.....	141
Références.....	147
Annexe 1	163
Annexe 2	231

Liste des illustrations

- Figure 1 :** Structure des vaisseaux sanguins.
- Figure 2 :** Représentation du processus de vasculogénèse extra-embryonnaire.
- Figure 3 :** Modèle pour la différenciation artérielle chez le poisson zèbre.
- Figure 4 :** Organisation du bourgeonnement par les tip-cells et les stalk-cells.
- Figure 5 :** Modèles de formation de la lumière.
- Figure 6 :** Représentation schématique du processus d'angiogénèse par l'intussusception.
- Figure 7 :** Les récepteurs au VEGF et leurs ligands.
- Figure 8 :** Voie de signalisation du VEGFR-2 et répercussions biologiques associées.
- Figure 9 :** Facteurs impliqués dans les phases d'activation et de maturation de l'angiogénèse.
- Figure 10 :** Mécanismes mécaniques et moléculaires impliqués dans les étapes de la migration d'une cellule endothéliale.
- Figure 11 :** Jonctions entre cellules endothéliales et adhésion focale.
- Figure 12 :** Représentation schématique du développement de la rétine.
- Figure 13 :** Biomicroscopie d'une CAM traitée au VEGF.
- Figure 14 :** Développement de la vascularisation chez le poisson zèbre.
- Figure 15 :** Protocole d'étude du développement vasculaire du poisson zèbre.
- Figure 16 :** Balance des activateurs et inhibiteurs de l'angiogénèse.
- Figure 17 :** Mécanismes déclencheurs de l'angiogénèse tumorale.
- Figure 18 :** Processus de l'angiogénèse tumorale et de la diffusion métastatique.
- Figure 19 :** Modélisation du glioblastome sur la CAM.
- Figure 20 :** Histologie du carcinome rénal à cellules claires.
- Figure 21 :** Stades des carcinomes rénaux.
- Figure 22 :** Voies de signalisation et cibles des agents thérapeutiques dans le RCC.
- Figure 23 :** Mécanismes de résistance potentielle aux thérapies visant le VEGF.
- Figure 24 :** Les moteurs moléculaires classiques.
- Figure 25 :** Cycle efficace de déplacement d'une kinésine le long d'un microtubule.
- Figure 26 :** Régulation de la liaison kinésine-cargo par trois mécanismes différents.
- Figure 27 :** Le transport intracellulaire par les kinésines dans les neurones, les cellules non neuronales et les cils.
- Figure 28 :** Les kinésines impliquées dans la mitose.
- Figure 29 :** Modèles pour les corrections de liaison des microtubules aux kinétochores via MCAK.
- Figure 30 :** Comparaison de la motricité d'Eg5 avec un moteur moléculaire typique associé aux mouvements du cou des kinésines.
- Figure 31 :** Fonction d'Eg5 au cours de la mitose via les interactions MT-MT.
- Figure 32 :** Représentation schématique du mouvement des chromosomes.
- Figure 33 :** MKLP-2 et Plk1 forment un dispositif détecteur de microtubules.
- Figure 34 :** Modèle simplifié des rôles des différentes kinésines au cours de la mitose.
- Figure 35 :** Structure de la kinésine Eg5 et de son domaine moteur.
- Figure 36 :** Eg5 est essentielle à la formation du fuseau bipolaire.
- Figure 37 :** Le monastrol cause des fuseaux monoastreaux dans les cellules en mitose.
- Figure 38 :** Le monastrol et deux de ses dérivés l'enastron et le diméthylenastron entraînent la formation du mono-astre.
- Figure 39 :** Structure chimique des inhibiteurs d'Eg5.
- Figure 40 :** Représentation de la structure de MKLP-2.

- Figure 41 :** Structure chimique du (Z)-2-(1H-Indol-3-yl)-3-(pyridin-3-yl)acrylonitrile, PAssenger PROteins TRANsport ou paprotrain ; inhibiteur de MKLP-2.
- Figure 42 :** Protocole de migration.
- Figure 43 :** Protocole de formation de tubes *in vitro*.
- Figure 44 :** Protocole d'ouverture des œufs de poulet 3 jours post-incubation.
- Figure 45 :** Injection des U87 dans le cerveau de souris immunodéficientes.
- Figure 46 :** Suivi par bioluminescence du volume tumoral grâce aux Renca-luciférase.
- Figure 47 :** Le VEGF induit l'expression d'Eg5 dans les HUVEC.
- Figure 48 :** Expression d'Eg5 au cours du cycle cellulaire des cellules HUVEC et les cellules tumorales U87.
- Figure 49 :** Immuno-blot d'Eg5 dans des différents types cellulaires tumoraux.
- Figure 50 :** Expression de MKLP-2 au niveau cellulaire et tissulaire.
- Figure 51 :** L'inhibition d'Eg5 par le DMN réduit la prolifération des cellules endothéliales et tumorales.
- Figure 52 :** L'inhibition de MKLP-2 inhibe la prolifération cellulaire.
- Figure 53 :** L'inhibition d'Eg5 bloque la mitose et induit la formation de mono-astre.
- Figure 54 :** L'inhibition d'Eg5 et de MKLP-2 induit l'apoptose des HUVEC.
- Figure 55 :** L'inhibition d'Eg5 et Mklp2 réduit la tubulogénèse des HUVEC.
- Figure 56 :** Immunofluorescence de BrDU sur des cellules en tubulogénèse.
- Figure 57 :** L'inhibition d'Eg5 et Mklp2 réduit l'adhérence des HUVEC sur les matrices.
- Figure 58 :** Rôle d'Eg5 dans la migration des cellules HUVEC.
- Figure 59 :** L'ispinesib inhibe les bourgeonnements émanant des anneaux aortiques.
- Figure 60 :** Le paprotrain inhibe les bourgeonnements émanant des anneaux aortiques.
- Figure 61 :** Le DMN et l'ispinesib inhibent l'angiogénèse et la croissance tumorales du glioblastome sur la CAM.
- Figure 62 :** Répartition des tumeurs en fonction de leur vascularisation.
- Figure 63 :** Effet de l'inhibition d'Eg5 sur le glioblastome U87.
- Figure 64 :** Effets des traitements avec l'Avastin, l'ispinesib ou la combinaison sur la vascularisation des glioblastomes.
- Figure 65 :** L'inhibition d'Eg5 par l'ispinesib ou le SB entraîne la formation d'un mono-astre dans les cellules Renca.
- Figure 66 :** Effet de l'ispinesib sur l'évolution du volume tumoral des tumeurs Renca implantées chez la souris BalbC.
- Figure 67 :** Le traitement des souris à l'ispinesib réduit le volume tumoral des carcinomes rénaux.
- Figure 68 :** Vascularisation des tumeurs Renca traitées à l'ispinesib mesylate.
- Figure 69 :** Le traitement des souris au SB-743921 réduit le volume tumoral.
- Figure 70 :** Le SB-743921 réduit la densité vasculaire et tumorale des tumeurs Renca.
- Tableau 1 :** Classification des gliomes.
- Tableau 2 :** Conditions d'ensemencement des cellules pour le test de prolifération.
- Tableau 3 :** Liste des anticorps utilisés.

Abréviations

ADP : Adénosine diphosphate

AVA : Avastin ou Bevacizumab (anticorps humanisé anti-VEGF)

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNi : ARN interférent

ATP : Adénosine Triphosphate

ABAE : Cellule endothéliale de l'aorte bovine

BEC: Cellule endothéliale sanguine

BHE : barrière hémato-encéphalique

BrDU : bromodéoxyuridine

BSA : Albumine de sérum de bovin

CAM: Membrane chorio-allantoïdienne

CE: Cellule endothéliale

CML: Cellule musculaire lisse

CMLV : Cellule musculaire lisse vasculaire

DA : Diacétylacétamide (solvant du SB-743921 pour le traitement des souris)

DEC : Dextrose Ethanol Cremophor (solvant de l'ispinesib mésylate pour le traitement des souris)

DMN: Diméthylénastron (inhibiteur d'Eg5)

DMSO: Diméthylsulfoxyde (solvant des inhibiteurs d'Eg5 et de MKLP-2 dans les tests *in vitro*)

FGF: Facteur de croissance fibroblastique

FITC: L'isothiocyanate de fluorescéine (molécule fluorescente)

Flt4 : Fms-related tyrosine kinase 4

GAP: Protéine activant les GTPases

GBM: Glioblastome multiforme

GEF: Facteur d'échange de guanine

GFP : Protéine Fluorescente Verte

GFAP : Protéine acide fibrillaire des cellules gliales.

H&E : Coloration Hématoxyline et éosine

HER2 : Facteur de croissance de l'épiderme humain 2

EPC : Cellule progénitrice endothéliale

hCMEC/D3: Cellule micro-vasculaire du cerveau humain

HUVEC: Cellule endothéliale de la veine ombilicale humaine

IL : Interleukine

IRO : Indirubin-3'-monoxyme (agent chimique anti-angiogénique)

ISP: Ispinesib mesylate (inhibiteur d'Eg5)

KIF : Protéines de la superfamille des Kinésines

LEC: Cellule endothéliale lymphatique

MCAK : kinésine associée aux centromères mitotiques

MMP : Métalloprotéinase

MRA : Actemra (inhibiteur d'IL6)

MEC: Matrice extracellulaire

MT: Microtubule
MTk : Microtubules kinétochoriens
MTOC : Centre Organisateur des MicroTubules
MKLP : Mitotic Kinesin Like Protein
PAF : Paraformaldéhyde
PAP: Paprotrain (inhibiteur de MKLP-2)
PBS : Tampon phosphate salin
PDGF : Facteur de croissance plaquettaire
PIGF : Facteur de la croissance placentaire
Plk1 : Polo kinase 1
RCC: Carcinome rénal à cellules claires
Shh : Sonic hedgehog
SVF : Sérum de Veau fœtal
TGF : Facteur de croissance transformant
TGI : Taux d'inhibition de la croissance tumorale
VEGF: facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR : récepteur de facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire
VHL : gène suppresseur de tumeur von Hippel Lindau

Introduction

I. Le développement du système vasculaire chez les vertébrés

1) Aspects anatomiques et physiologiques

Le système vasculaire est indispensable au fonctionnement des autres systèmes de l'organisme. Il permet l'oxygénation et l'alimentation de ceux-ci, le transport d'hormones et de déchets ainsi que la régulation du pH et de la température du corps. Il est constitué du cœur permettant de propulser le sang à travers les vaisseaux sanguins.

Les vaisseaux divergent par leur taille, leur fonction et leur constitution. Les artères (artères élastiques, artérioles) acheminent le sang provenant du cœur dans la circulation alors que les veines ramènent le sang des poumons et d'autres organes vers le cœur. Les capillaires sont des vaisseaux microscopiques qui naissent des artérioles et rejoignent les veinules via un réseau fortement anastomosé. Ils constituent le lieu d'échange entre le sang et les tissus.

Les vaisseaux sanguins sont constitués de différentes couches de cellules appelées tuniques. Celles-ci possèdent chacune une composition et une fonction propre.

- La tunique interne (intima)

Elle est constituée d'une couche unicellulaire de cellules endothéliales en contact avec le sang ainsi que d'une couche interne de tissu conjonctif. La composition de cette couche varie peu selon les vaisseaux, cependant dans les artères élastiques, l'intima, très épaisse peut contenir des cellules musculaires lisses (CML) particulières dites myointimales. Quel que soit le diamètre de la paroi, il y a toujours une seule couche de cellules endothéliales.

- La tunique moyenne (media)

Cette tunique recouvre l'endothélium dans les moyens et gros vaisseaux du côté abluminal. Elle est constituée de CML auxquelles peuvent s'ajouter des fibres élastiques de collagène et d'élastine. Ces dernières assurent le tonus vasculaire grâce à leur propriété contractile.

- La tunique externe (adventice ou externa)

Elle est constituée de fibres de collagène et de tissu conjonctif et permet l'ancrage des vaisseaux dans le tissu. Des petits vaisseaux, les vasa vasorum, cheminent cette tunique afin de vasculariser les vaisseaux de gros calibre.

Ces trois tuniques enveloppent tout l'arbre vasculaire à l'exception des capillaires (*figure 1*). Leur structure se résume à un endothélium entouré de quelques cellules stabilisantes, les péricytes. Cette unité vasculaire est aussi associée aux astrocytes et aux neurones au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Abbott et al., 2006).

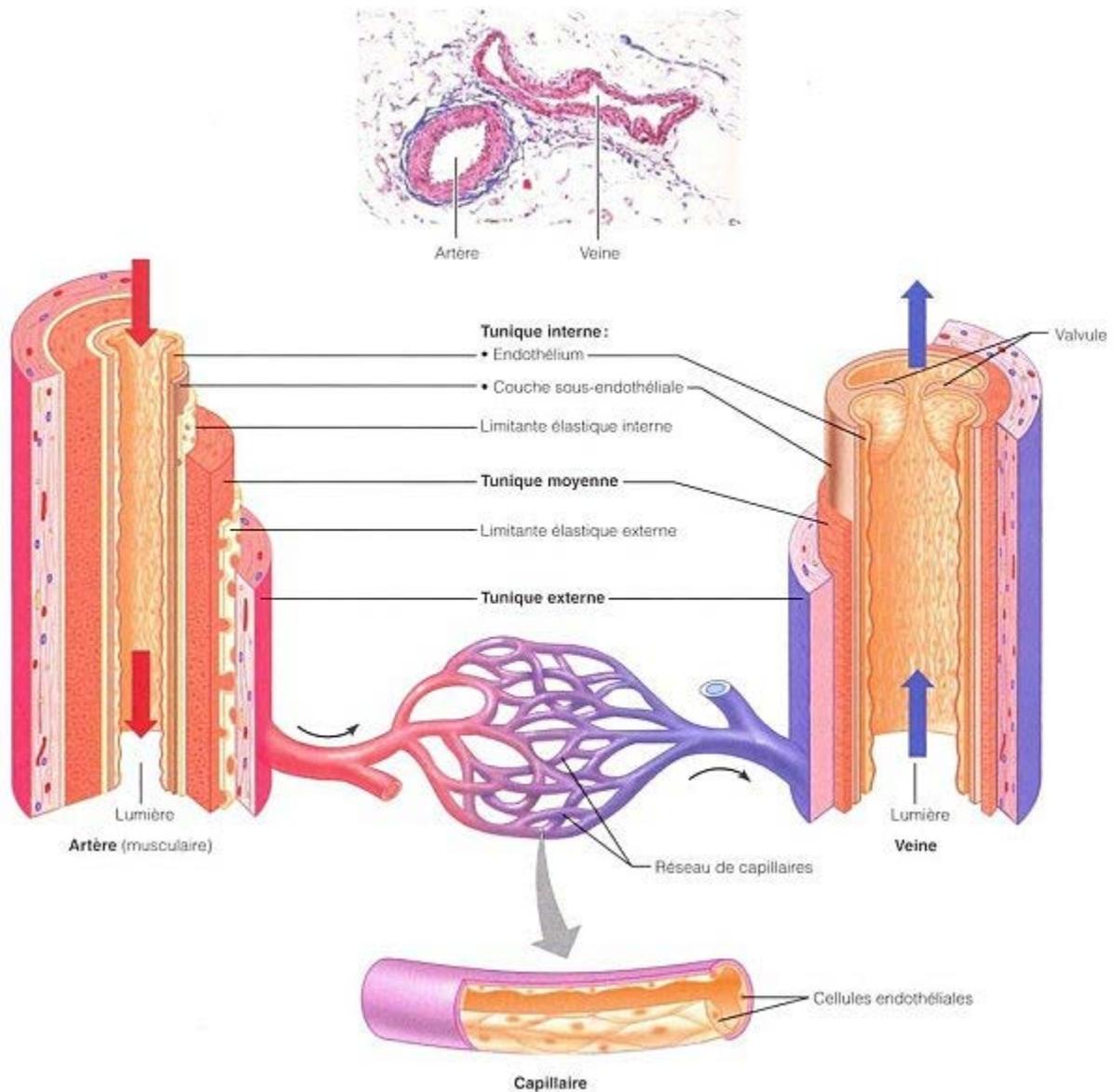


Figure 1: Représentation schématique de la structure des vaisseaux sanguins. Coloration hématoxyline/éosine réalisée sur une coupe transversale. (D'après J. Harlè, 2009).

2) La mise en place du système vasculaire

Au cours du développement, les vaisseaux se forment via deux mécanismes principaux : la vasculogénèse et l'angiogénèse.

Au début du développement embryonnaire, les nutriments et l'oxygène parviennent par diffusion aux tissus, puis un réseau vasculaire primitif est formé via le processus de vasculogénèse. La vasculogénèse est impliquée dans le développement de plusieurs vaisseaux majeurs tels que l'aorte dorsale, les veines cardinales postérieures ainsi que la formation des veines et des artères du sac vitellin embryonnaire (Pardanaud et al., 1987) (Noden, 1989).

2.1) Formation des vaisseaux

Elle débute par l'agrégation et la spécification des cellules mésodermiques du sac vitellin en hémangioblastes, précurseurs des cellules endothéliales et sanguines. Les hémangioblastes forment des îlots sanguins extra-embryonnaires. Les cellules situées à l'intérieur des îlots, se différencient en cellules hématopoïétiques pluripotentiels (précurseurs des cellules sanguines et lymphatiques) alors que celles à la périphérie de ces agrégats se différencient en angioblastes (précurseurs des cellules endothéliales vasculaires) (Patel-Hett et D'Amore, 2011).

Cette différenciation des hémangioblastes en angioblastes est induite par des facteurs de croissance tels que le facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF-2), le facteur de croissance transformant β (TGF β) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) (Pardanaud et al., 1989). Ces angioblastes migrent, prolifèrent puis se différencient en cellules endothéliales (CE) (*figure 2*).

Puis, les CE forment des tubes via un signal, sonic hedgehog (Shh), provenant du tissu endodermale (adjacent au mésoderme) (Vokes et al., 2004). Ces tubes endothéliaux se connectent ensuite pour former un réseau de capillaires désorganisé appelé le plexus primaire (Patel-Hett et D'Amore, 2011) (*figure 2*). A la fin de la vasculogénèse, le réseau vasculaire primitif constitué dans le sac embryonnaire fusionne avec le système circulatoire intra-embryonnaire néoformé.

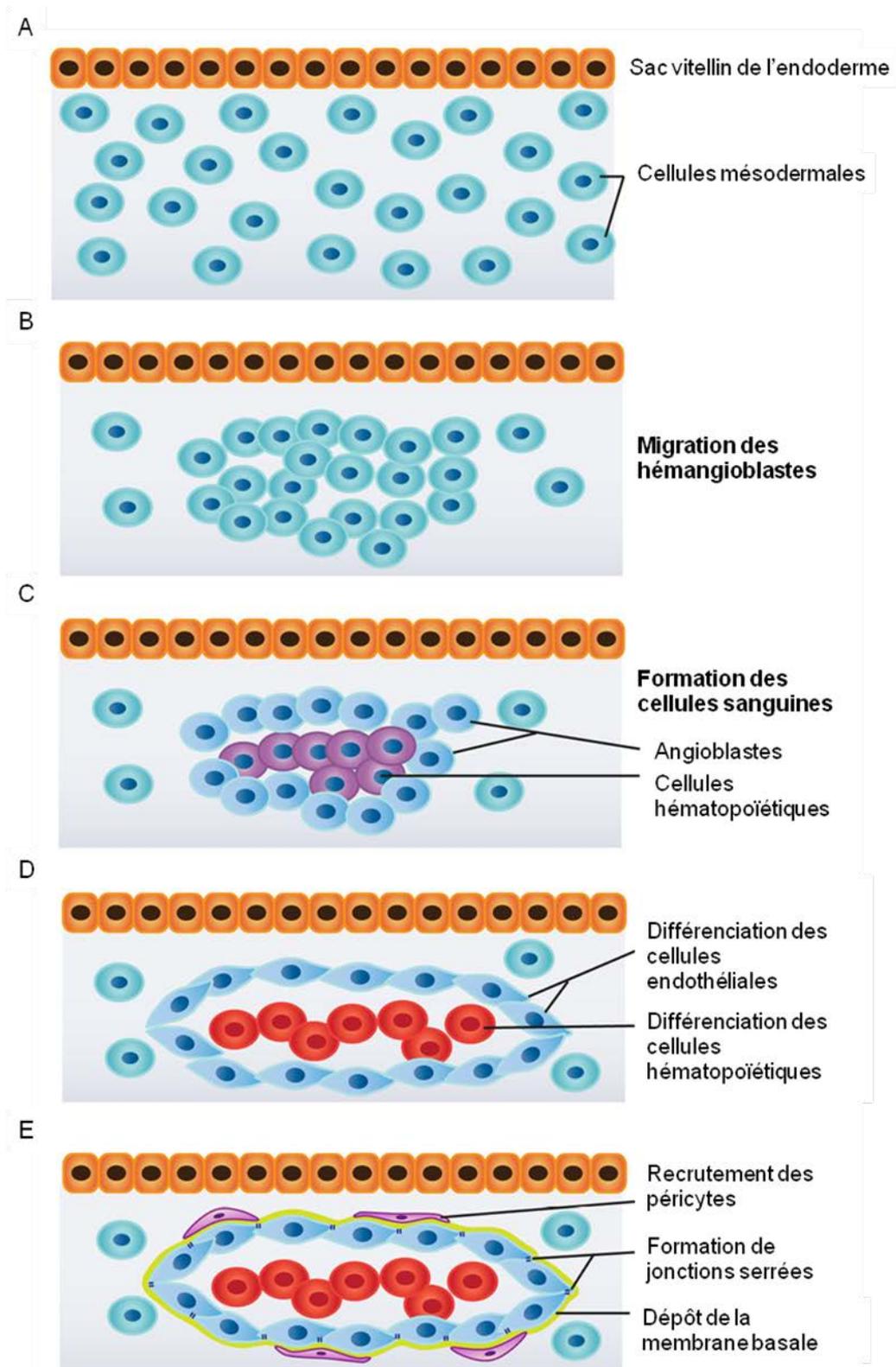


Figure 2: Représentation du processus de vasculogenèse extra-embryonnaire. Les cellules endodermiales induisent des cellules mésodermiales initiant la vasculogenèse (A). Les hémangioblastes migrent et s'associent (B). Formation des îlots sanguins contenant au centre des précurseurs hématopoïétiques et à la périphérie des angioblastes (C). Différenciation des angioblastes en cellules endothéliales (en bleu) et des précurseurs hématopoïétiques (D). Luminisation et formation de jonctions serrées entre les cellules endothéliales. L'association des péricytes est corrélée avec le dépôt de la membrane basale et marque la maturation du vaisseau. (D'après Patel-Hett et D'Amore, 2011).

2.2) Différenciation artérielle

La différenciation artérielle a été mise évidence chez le poisson zèbre et met en jeu une interaction complexe entre différentes voies de signalisation. Durant la somitogenèse, l'expression de Shh dans la notochorde conduit à l'expression du VEGF dans les tissus adjacents. A son tour le VEGF est exprimé à proximité des angioblastes, lesquels migrent vers la ligne médiane (*figure 3a*). Au stade 16-18 somites, les angioblastes coalescent dans l'aorte dorsale en développement et dans la veine cardinale postérieure. Durant ce temps, l'exposition des futures cellules artérielles au VEGF induit la signalisation de Notch, laquelle résulte de l'expression de gènes spécifiques des artères tels que la neuropiline-1 (NRP1) (*figure 3b*). De plus, la signalisation de Notch réprime des gènes exprimés dans les veines tels que flt4, le récepteur tyrosine kinase de type 4, la neuropiline-2 (NRP2) et le récepteur Ephrine B4 (*figure 3c*) (Lawson et Weinstein, 2002).

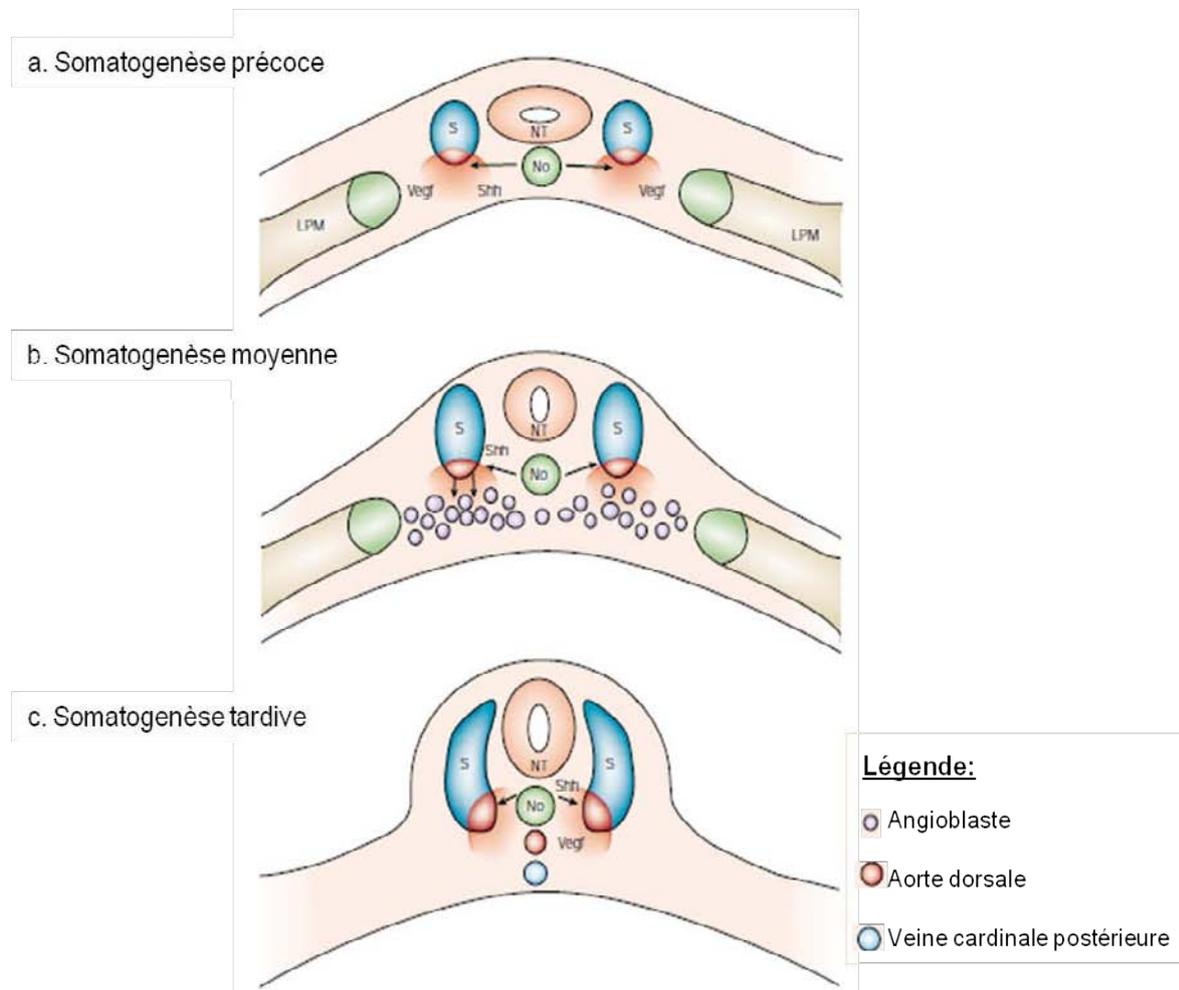


Figure 3: Modèle pour la différenciation artérielle chez le poisson zèbre. Pendant la somitogenèse, la signalisation de Notch permet la différenciation artérielle via la régulation de gènes spécifiques aux veines et aux artères. No : notochorde, NT : tube neural, S : somite. (D'après Lawson et Weinstein, 2002).

La vasculogénèse n'est pas exclusive à l'embryogénèse et peut se produire au stade adulte. La moëlle osseuse contient des progéniteurs endothéliaux qui comporteraient des caractéristiques similaires aux angioblastes embryonnaires (Luttun et al., 2002; Rafii et al., 2002).

Le réseau capillaire primitif issu de la vasculogénèse, va s'étendre et se complexifier grâce à un autre phénomène, l'angiogénèse (Carmeliet, 2004).

3) L'angiogénèse

L'angiogénèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant (Risau, 1997) (*figure 9*). Au niveau physiologique, ce processus permet le développement de l'embryon, la cicatrisation et le cycle menstruel.

3.1) Les principales formes d'angiogénèse

3.1.1) Le bourgeonnement (sprouting)

La construction d'un nouveau capillaire est déterminée par une **phase d'activation** au cours de laquelle les cellules endothéliales activées par un facteur angiogénique, vont migrer et proliférer. Ensuite vient une **phase de maturation** qui a pour but de reconstituer la membrane basale autour des nouveaux capillaires et de leur assurer une couverture murale qui leur permettra de survivre en état de quiescence (sans VEGF environnant) pendant plusieurs mois.

La phase d'activation peut être séparée en plusieurs étapes :

- **La vasodilatation et la perméabilité vasculaire**

Le VEGF déclenche un relâchement des interactions entre les CE, la matrice extra-cellulaire (MEC) et les péricytes. Les péricytes se détachent des vaisseaux ce qui augmente la perméabilité vasculaire.

- **La dégradation de la membrane basale et de la MEC**

Ce processus implique des héparanases ou plusieurs protéases (métalloprotéinases, collagénase et u-PA, activateur du plasminogène) synthétisées par les CE (Chang et Werb, 2001; Pepper, 2001; Vlodavsky et Goldshmidt, 2001).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont les principales protéases impliquées dans le remodelage de la membrane basale et de la MEC (Sternlicht et Werb, 2001).

La dégradation de la membrane basale et de la MEC entraîne d'une part, le détachement des CE de la paroi vasculaire du vaisseau pré-existant et d'autre part, la libération de facteurs de croissance tels que le VEGF et le FGF-2 normalement séquestrés dans la MEC. Ces facteurs de croissance vont participer à la prolifération, la migration et l'attraction chimiotactique des CE (Brooks, 1996; Gerhardt et al., 2003; Stetler-Stevenson, 1999).

- **La migration et la prolifération des CE**

La migration de cellules peut correspondre à un phénomène individuel ou collectif comme dans le cas du bourgeonnement des CE lors du phénomène d'angiogenèse. Ce processus motile essentiel à l'angiogenèse est directionnellement régulé par divers stimuli (méchanotactique, chimiotactique et haptotactique). La stimulation des CE par un facteur angiogénique tel que le VEGF entraîne la prolifération des cellules et leur migration selon un gradient de VEGF. Une fois les CE activées, elles réorganisent leur cytosquelette d'actine.

Une hiérarchisation se met en place au sein des cellules migrantes. A l'extrémité des bourgeons, des CE jusque là quiescentes vont acquérir certaines caractéristiques leur permettant de guider le bourgeonnement selon un gradient de VEGF défini par les tissus en déficit d'oxygène (Gerhardt et al., 2003). Ces cellules appelées cellules de pointe ou « **tip-cells** » émettent des prolongements, les filopodes, qui leur permettent des interactions avec l'environnement matriciel. Les cellules au contact de la tip-cell, les « **stalk-cells** » (cellules organisées en tige) adoptent aussi un phénotype différent des autres CE. Elles restent alignées et jointives derrière la tip-cell et allongent progressivement le bourgeon vasculaire par le biais de divisions mitotiques sous l'influence du VEGF.

La spécification en tip-cell est contrôlée par le système Notch/Dll4 (*figure 4-1*) et s'effectue entre des cellules endothéliales adjacentes au front angiogénique. Initialement, l'expression de Dll4 (une protéine transmembranaire) et celle de son ligand le récepteur Notch seraient équilibrées dans les cellules endothéliales (*en jaune*) (*figure 4-2*) jusqu'à ce que des tip-cells potentielles (*en vert*) augmentent l'expression de Dll4 en réponse au VEGF. Par conséquent, l'expression de Notch est augmentée dans des cellules voisines (*en rouge*), ce qui inhibe l'expression de récepteurs au VEGF (VEGFR-2 et VEGFR-3) dans ces cellules (*figure 4-3*). Ainsi, les tip-cells exprimant Dll4 réagissent le plus fortement à la signalisation du VEGF et acquièrent un phénotype mobile, envahissant et germant. Ce comportement « tip-cells » est supprimé dans les stalk cells exprimant un autre ligand de Notch, Jagged-1. L'abolition de cette signalisation Notch/Dll4 aboutit à un bourgeonnement anarchique avec plusieurs tip-cells à chaque embranchement (Claxton et Fruttiger, 2004).

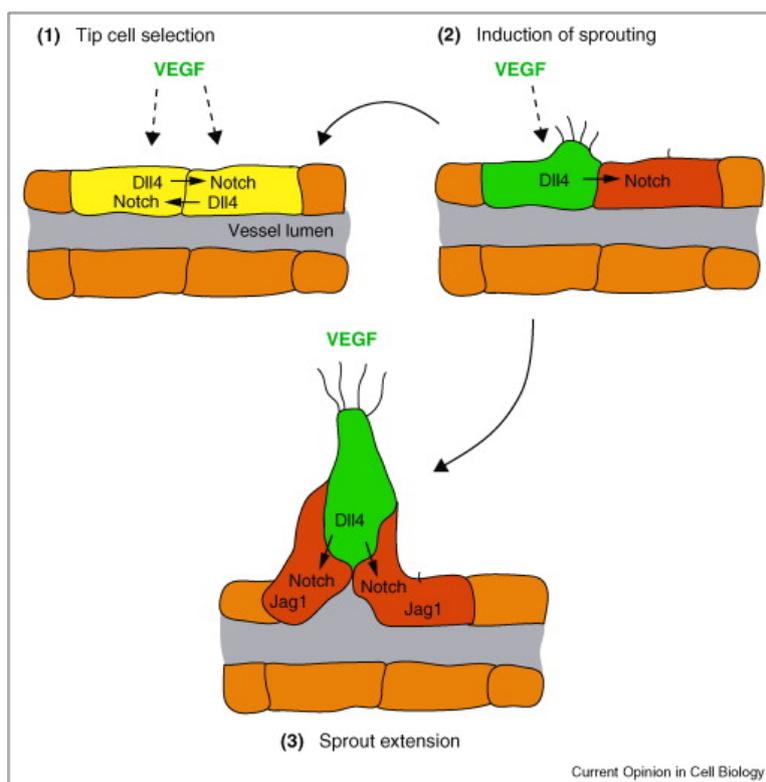


Figure 4: Organisation du bourgeonnement par les tip-cells et les stalk-cells. (D'après Eilken et Adams 2010).

Les CE migrent à travers la MEC vers la source angiogénique en formant des cordes de cellules qui vont s'assembler en un tube et créer une lumière vasculaire. La formation de cette lumière vasculaire passe par divers mécanismes.

Des observations des vaisseaux intersomitiques indiquent que les CE forment une lumière vasculaire par coalescence de leur vacuole qui s'interconnecte avec les vacuoles de cellules voisines (*figure 5C*).

D'autres études suggèrent que les cellules changent de forme et réajustent leurs jonctions adhérentes pour créer une lumière (*figure 5C'*). Dans ce modèle, les premières CE définissent la polarité apicale-basale. Des glycoprotéines, telles que la cadhérine de l'endothélium vasculaire (**VE-cadhérine**), s'accumulent ensuite à la membrane apicale (donc luminale) ce qui lui confère un signal répulsif, permettant la formation de la lumière. Il a aussi été montré que le VEGF participe à des changements ultérieurs dans la forme des CE permettant d'étendre la lumière. Les mécanismes de formation de la lumière sont dépendants du type de formation des vaisseaux (Potente et al., 2011).

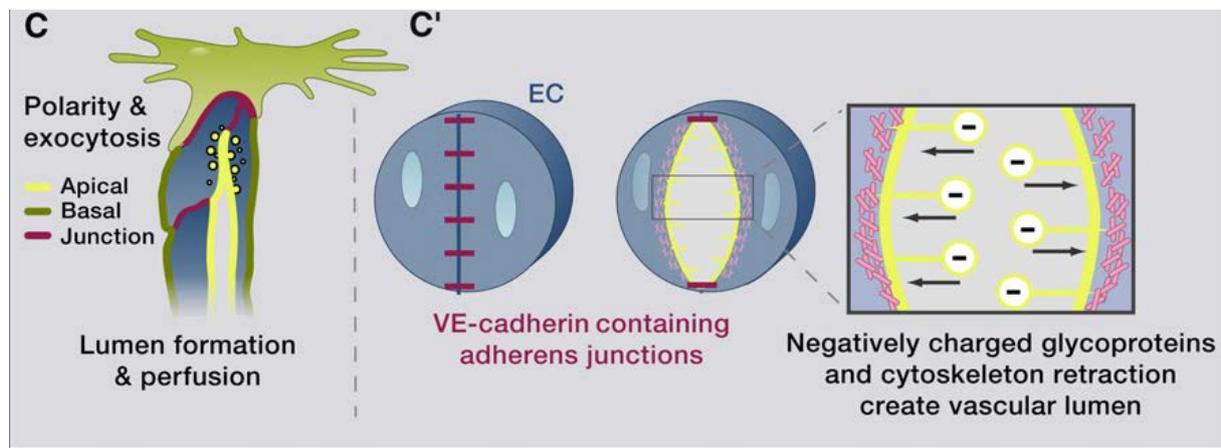


Figure 5: Modèles de formation d'une lumière. La lumière est créée par fusion de vésicules pinocytotiques (C) ou par contraction des CE suivant les glycoprotéines chargées négativement (VE-cadhérines) ce qui entraîne une rétraction du cytosquelette (C') (D'après Potente et al., 2011).

3.1.2) L'intussusception

L'angiogenèse par intussusception nécessite un ré-arrangement des structures préformées.

Ce processus morphogénétique permet la formation d'un néo-vaisseau par division d'un unique vaisseau en deux lumières. L'arborisation intussusceptive cause des modifications de taille, de position et forme préférentiellement des segments capillaires perfusés, créant un arbre hiérarchique. Elle peut être divisée en 4 étapes :

1. Elle débute par la **protrusion des parois** opposées des capillaires dans la lumière aboutissant à la création d'une zone de contact entre les cellules endothéliales (*figure 6b*).
2. Ce contact entre les deux parois opposées du capillaire entraîne **une réorganisation des jonctions entre les cellules endothéliales** et la bicouche endothéliale est perforée au centre formant une **séparation interstitielle** (Patan et al., 1996) (*figure 6c*).
3. Les **myofibroblastes et péricytes envahissent la séparation interstitielle**. Ces cellules péri-capillaires vont alors synthétiser une MEC permettant d'augmenter la séparation entre les deux vaisseaux fils (Djonov et al., 2003) et le dépôt dans la matrice des piliers d'un diamètre allant de 1 à 2.5 μm (*figure 6d*).
4. L'**élargissement de la circonférence des piliers** sans altération qualitative supplémentaire (Kurz et al., 2003).

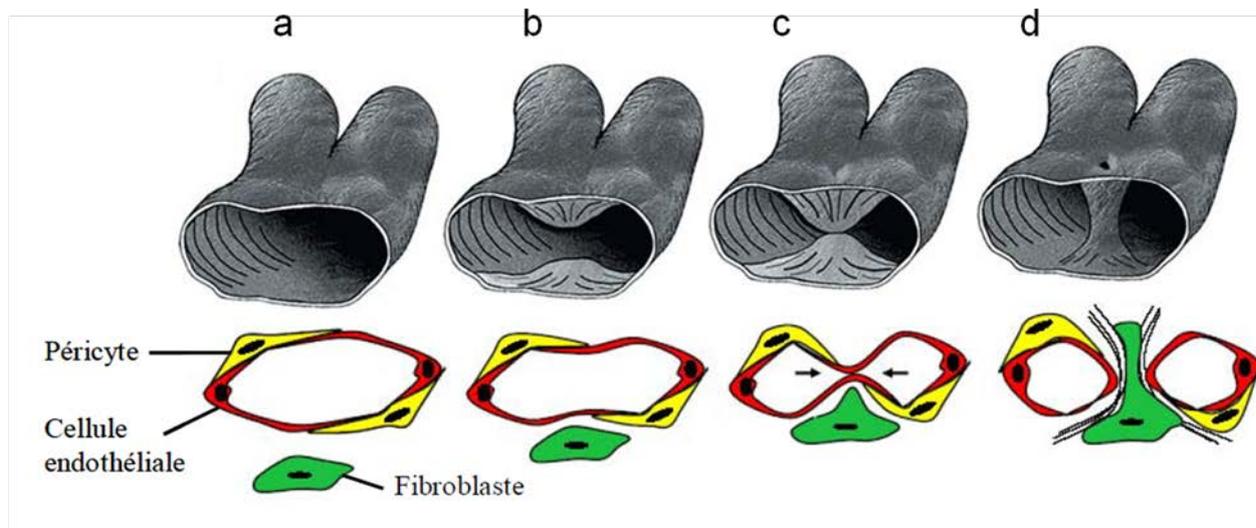


Figure 6: Représentation schématique du processus d'angiogenèse par l'intussusception. A partir du capillaire initial (a), le processus commence par une protrusion des paroi opposées (b,c). Une fois le contact établi, la bicouche de cellules endothéliales est perforée au centre et un pilier transluminal est formé (d). Ce processus est représenté en trois dimensions et en dessous en deux dimensions. (D'après Djonov et al., 2003).

Ce phénomène a été observé au niveau de plusieurs tissus tels que les capillaires pulmonaires ou la rétine, et chez plusieurs espèces incluant l'homme, la souris, le rat et le poulet (Djonov et al., 2003).

3.1.3) La maturation des vaisseaux

Les vaisseaux néoformés par vasculogenèse ou angiogenèse subissent des modifications de taille ou de composition afin de répondre aux besoins en oxygène et en nutriments. Ce processus appelé remodelage vasculaire ou « pruning » est suivi d'une maturation.

- **Le remodelage vasculaire**

Le remodelage transforme le plexus primaire en un réseau hiérarchisé d'artères, de veines et de capillaires. Suite aux interactions avec son environnement, le vaisseau perçoit des signaux qu'il intègre via des communications intercellulaires. Il sécrète alors des médiateurs qui vont modifier son environnement et influencer sa propre structure et sa fonction. Le vaisseau est alors remodelé par extension ou régression via des processus de croissance ou de mort cellulaire. Les signaux peuvent être de diverses origines mais sont habituellement générés par des modifications des conditions hémodynamiques. Les forces de cisaillement générées par la circulation sanguine entraînent des modifications au niveau des jonctions entre les CE, les cellules murales et les composants de la MEC. En réponse à ces forces, la transcription du PDGF-B est augmentée, ce qui favorise le recrutement des cellules péri-endothéliales. Ces

forces hémodynamiques régulent aussi le renouvellement des CE au niveau de la paroi vasculaire (Dimmeler et al. 1996) et vont influencer le devenir du vaisseau.

- **Stabilisation des vaisseaux**

Les vaisseaux naissants sont stabilisés par deux processus : le **recrutement de cellules murales** et **l'élaboration d'une MEC** commune aux cellules endothéliales (CE) et aux cellules murales.

Les cellules murales, péricytes et cellules musculaires lisses (CML), participent à la stabilisation vasculaire en inhibant la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Darland et D'Amore 2001).

Les précurseurs des cellules murales proviennent des tissus mésenchymateux chez l'embryon et de la moelle et du stroma osseux chez l'adulte (Carmeliet et al., 2000).

Il est également aussi connu que des cellules matures peuvent se différencier en cellules murales. En effet, les fibroblastes, après s'être différenciés en myofibroblastes, peuvent acquérir le phénotype de CML vasculaires (Chambers et al., 2003; Tomasek et al., 2002) et des cellules endothéliales peuvent se différencier en cellules murales péricytaire ou musculaires lisses (DeRuiter et al., 1997). Ce phénomène a été caractérisé au niveau de l'aorte dorsale. Les péricytes peuvent avoir aussi pour origine des CML proches qui se sont différenciées, ont proliféré, puis se sont incorporées dans de nouveaux vaisseaux (Lindahl et al., 1997; Hellstrom et al., 1999). Une fois recrutées, les cellules murales prolifèrent et migrent via la sécrétion du PDGF-B par les CE (Hellstrom et al., 2001). Ainsi il a été montré que des souris déficientes en PDGF-B présentent un manque de péricytes et développent des micro-anévrismes de capillaires (Lindahl et al., 1997). Le TGF- β 1 permet ensuite la différenciation des cellules murales en péricytes ou en CML (Hirschi et al., 1998). Récemment, il a été montré que la protéine morphogénétique osseuse (BMP9), qui est un ligand spécifique du récepteur au TGF- β 1, est impliquée dans le remodelage vasculaire (Ricard et al., 2012).

Afin de maintenir l'homéostasie du vaisseau, les CE et les cellules murales communiquent via des interactions stabilisées par la fixation de l'angiopoiétine-1 sur son récepteur Tie2 (Davis et al., 1996). La fixation de son homologue l'angiopoiétine-2 abolit les interactions entre CE et cellules murales, aboutissant à une déstabilisation du vaisseau (Maisonpierre et al., 1997). Un vaisseau dépourvu de cellules murales régresse en absence de facteurs de croissance tels que le VEGF-A. En présence de VEGF-A, il peut se maintenir ou être à l'origine d'un nouveau bourgeonnement angiogénique (Holash et al., 1999).

Le rôle des péricytes ne se résume pas à la stabilisation des vaisseaux et il a été montré qu'ils peuvent percevoir les besoins physiologiques des tissus en présence du stimulus angiogénique, détecter les forces hémodynamiques, stabiliser ou dégrader la MEC, agir sur la différenciation ou la prolifération des CE, interagir avec de nombreuses CE et intégrer les signaux de long du vaisseau.

La MEC, qui occupe l'espace entre les cellules, est synthétisée par les cellules qui l'entourent. Ses principales macromolécules sont des protéines fibreuses de structure (collagène et élastine), des glycoprotéines des protéines fibreuses d'adhérence (fibronectine et laminine) et des glycosaminoglycanes et les protéoglycanes.

3.2) La régulation de l'angiogenèse par le VEGF

Il existe de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF, le TGF- α et TGF- β , le facteur de croissance hépatique (HGF), le facteur de nécrose tumorale (TNF), l'angiogénine, l'interleukine-8 et les angiopoiétines etc. Parmi eux, les facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) font partie des régulateurs les plus importants (Bikfalvi, 2007; Karamysheva, 2008). Ils sont sécrétés sous différentes isoformes (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF)) qui diffusent plus ou moins facilement dans la MEC et vont se fixer sur différents récepteurs : VEGFR-1/FLT1, VEGFR-2/FLK1/KDR et le VEGFR-3 (Ellis et Hicklin, 2008).

Les VEGFR sont des récepteurs tyrosine kinase de type III, constitués d'un domaine extracellulaire composé de domaines immunoglobuline qui permettent la fixation du ligand VEGF, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire contenant un domaine tyrosine kinase. Ils peuvent être associés à d'autres récepteurs, les neuropilines (NRP) (*figure 7*), qui sont impliqués dans le développement neuronal. Ceux-ci agissent comme des co-récepteurs de VEGFR-1 et VEGFR-2 et augmentent l'affinité des ligands pour ces récepteurs (Pan et al., 2007). D'autres co-récepteurs des VEGFR ont été identifiés tels que la cadhérine de l'endothélium vasculaire (VE-cadhérine) et les intégrines. Les intégrines contenant la sous unité $\beta 3$ se lient spécifiquement au VEGFR-2 et augmentent ainsi la signalisation du récepteur (Borges et al., 2000). Il a aussi été montré que les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ s'associent au VEGFR-2 pour moduler la lymphangiogenèse lors de la réparation tissulaire (Hong et al., 2004). La VE-cadhérine, qui est responsable des jonctions adhérentes entre CE, interagit avec le VEGFR-2 pour moduler sa signalisation (Carmeliet et al., 1999).

L'affinité du VEGFR-1 pour le VEGF est environ 10 fois celle du VEGFR-2, mais ses capacités à produire un signal de prolifération sont beaucoup plus faibles.

Le VEGFR-3 est impliqué dans la lymphangiogenèse via la fixation de ses ligands, le VEGF-C et le VEGF-D (Alitalo et Carmeliet, 2002).

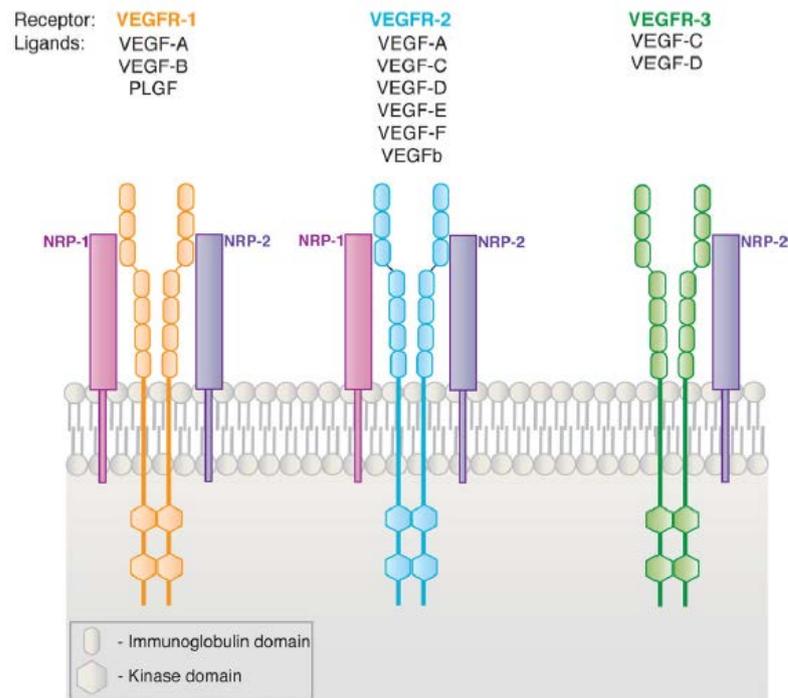


Figure 7: Les récepteurs au VEGF et leurs ligands. Les co-récepteurs des VEGFR sont montrés adjacents aux récepteurs auxquels ils sont associés. Le VEGF-A VEGF-B VEGF-E et PIGF se lie à NRP-1 lequel est associé au VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF-A VEGF-C VEGF-D et PIGF lie NRP-2 qui complexe avec VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. (D'après Patel-Hett et D'Amore, 2011).

Le VEGFR-2 est le principal récepteur impliqué dans l'angiogenèse. Il est majoritairement situé sur la membrane des cellules endothéliales. La fixation du VEGF au VEGFR-2 provoque la dimérisation de ce récepteur et l'activation de son activité tyrosine kinase ce qui génère plusieurs types de signaux.

La fixation du VEGF au VEGFR-2 contribue aux différentes étapes de l'angiogenèse via l'activation des voies de signalisation. Par exemple, la phosphorylation du résidu Y1175 active PLC- γ qui à son tour stimule la protéine kinase C (PKC), conduit à l'activation de l'inositol Triphosphate (PI3). Cette voie de signalisation stimule la cascade Raf/MEK/MAPK, ce qui entraîne la prolifération des cellules endothéliales (figure 8).

Le résidu Y951 joue également un rôle important dans l'angiogenèse via sa liaison à la protéine adaptatrice TSAAd qui à son tour se lie à Src, régulant l'actine du cytosquelette et la migration des CE.

Le VEGF déclenche aussi une augmentation de l'activité de l'enzyme eNOS (endothelial Nitric Oxyde Synthase) via la voie PI3K/Akt. eNOS entraîne alors une augmentation de monoxyde d'azote (NO) intracellulaire qui conduit à une vasodilatation et à une augmentation de la perméabilité vasculaire (figure 8).

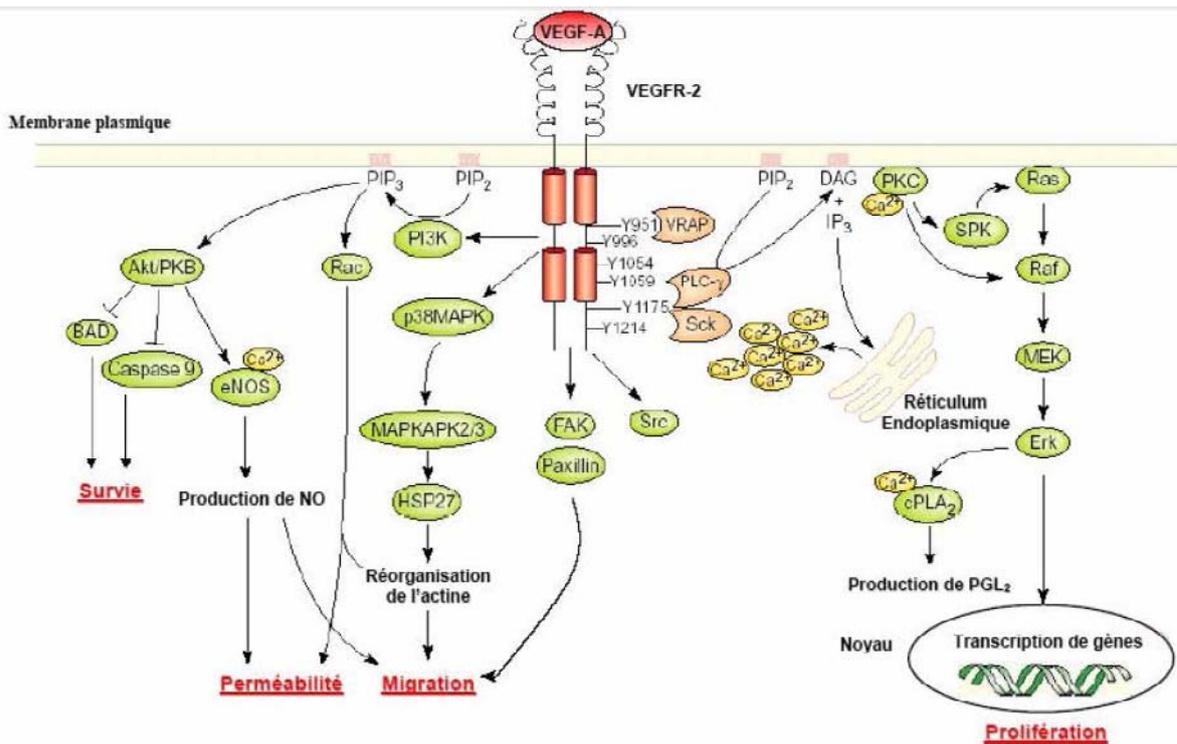


Figure 8: Voie de signalisation du VEGFR-2 et répercussions biologiques associées. Le VEGF-A via sa fixation sur son récepteur VEGFR-2 déclenche plusieurs voies de signalisation cellulaire pour réguler la survie, la prolifération, la migration cellulaire ainsi que la perméabilité vasculaire. (D'après Cross, 2003).

Schéma récapitulatif

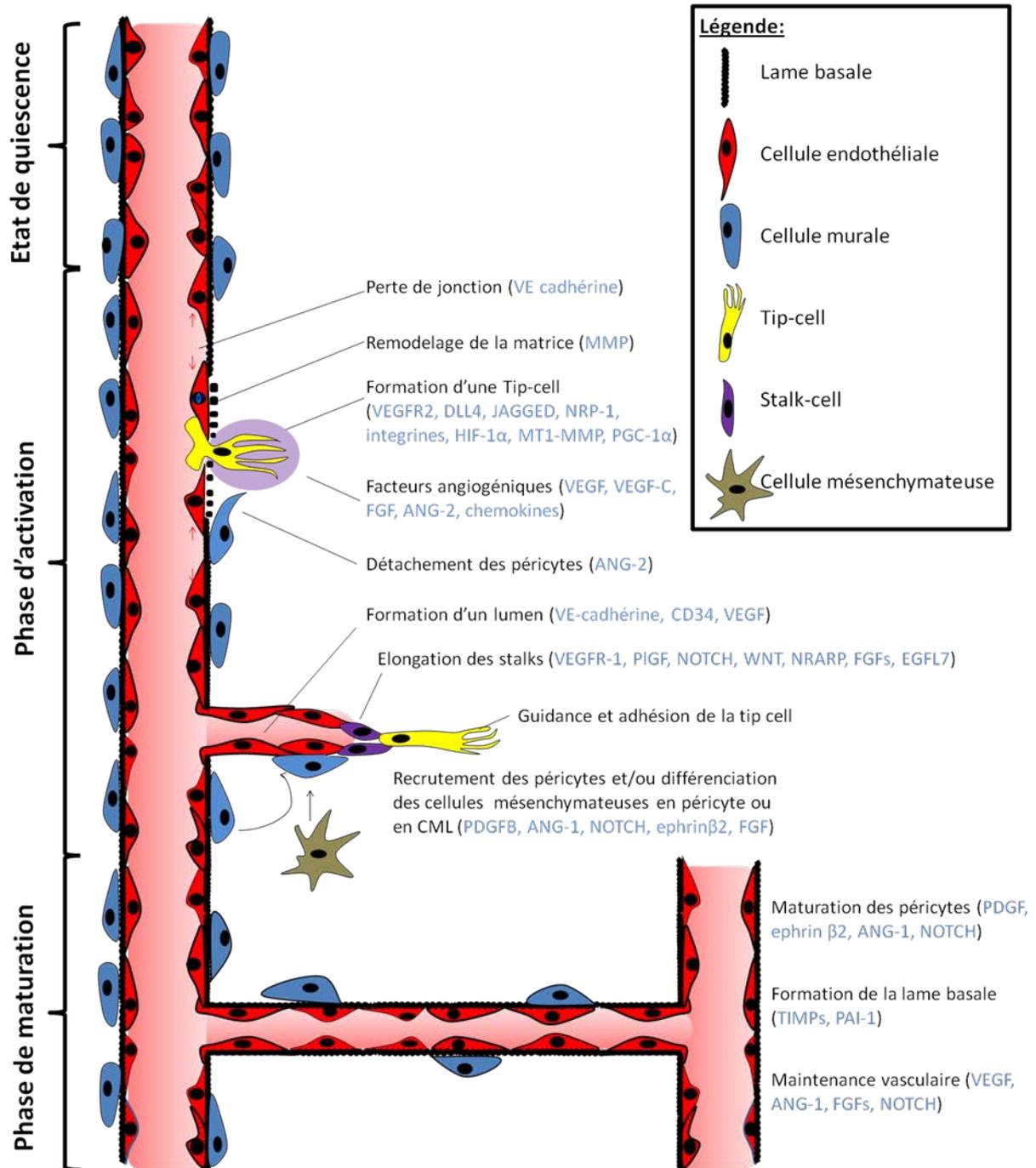


Figure 9: Facteurs impliqués dans les phases d'activation et de maturation de l'angiogenèse. La phase d'activation débute par l'induction d'un signal pro-angiogénique qui entraîne une perte de jonctions VE-cadhérine entre cellules endothéliales, la digestion de la matrice par les MMP ainsi qu'un détachement des péricytes. Divers facteurs tels que DLL4 et JAGGED induisent la spécification de cellules endothéliales en tip-cell ou en stalk-cell. Ces cellules guident la migration en corde des CE, en créant une lumière, selon un gradient de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF et les chimiokines. La stabilisation du vaisseau créé est assurée par les cellules murales. Le vaisseau créé se connecte à un autre vaisseau et sa maintenance est assurée par une sécrétion basale de facteurs pro-angiogéniques. (Créé d'après Carmeliet et Jain, 2011).

4) Modèles pour étudier l'angiogenèse physiologique

4.1) Modèles *in vitro*

La formation d'un vaisseau passe par une série de mécanismes incluant la digestion de la membrane basale, la prolifération, la migration et la formation de tubes des cellules endothéliales (Ausprunk et Folkman, 1977).

Des modèles *in vitro* permettent de simuler le comportement des cellules *in vivo* dans un contexte contrôlé.

4.1.1) La prolifération

La prolifération des cellules endothéliales est un phénomène clé dans les premières étapes de l'angiogenèse. De nombreux tests permettent d'évaluer ce phénomène *in vitro*, parmi eux :

- l'**incorporation de la bromodéoxyuridine** (BrdU) dans les cellules nouvellement synthétisées peut être révélée par immuno-marquage. Le taux de prolifération peut être déterminé par comptage des cellules positives en BrdU ou par quantification de fluorescence.

- l'**activité enzymatique** est un test colorimétrique qui mesure l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Celle-ci étant considérée comme proportionnelle au nombre de cellules.

- la **surface de recouvrement des cellules** peut être mesurée au cours du temps par l'Incucyte. Ce microscope compact peut être placé dans un incubateur à cellules. Il est relié à un ordinateur et réalise des mesures automatisées de la confluence des cellules.

- le **comptage** du nombre de cellules. Les cellules qui ont proliféré en absence ou en présence de facteurs, sont comptées.

4.1.2) La migration

De manière mécanistique, une cellule migre grâce au remodelage de son cytosquelette d'actine, lui permettant de créer des structures telles que les lamellipodes, les filopodes ou les fibres de stress (*figure 10*) (Lamalice et al., 2007). De nombreuses molécules telles que les intégrines et le VEGFR-2 sont impliquées dans ce remodelage (Lamalice et al., 2007).

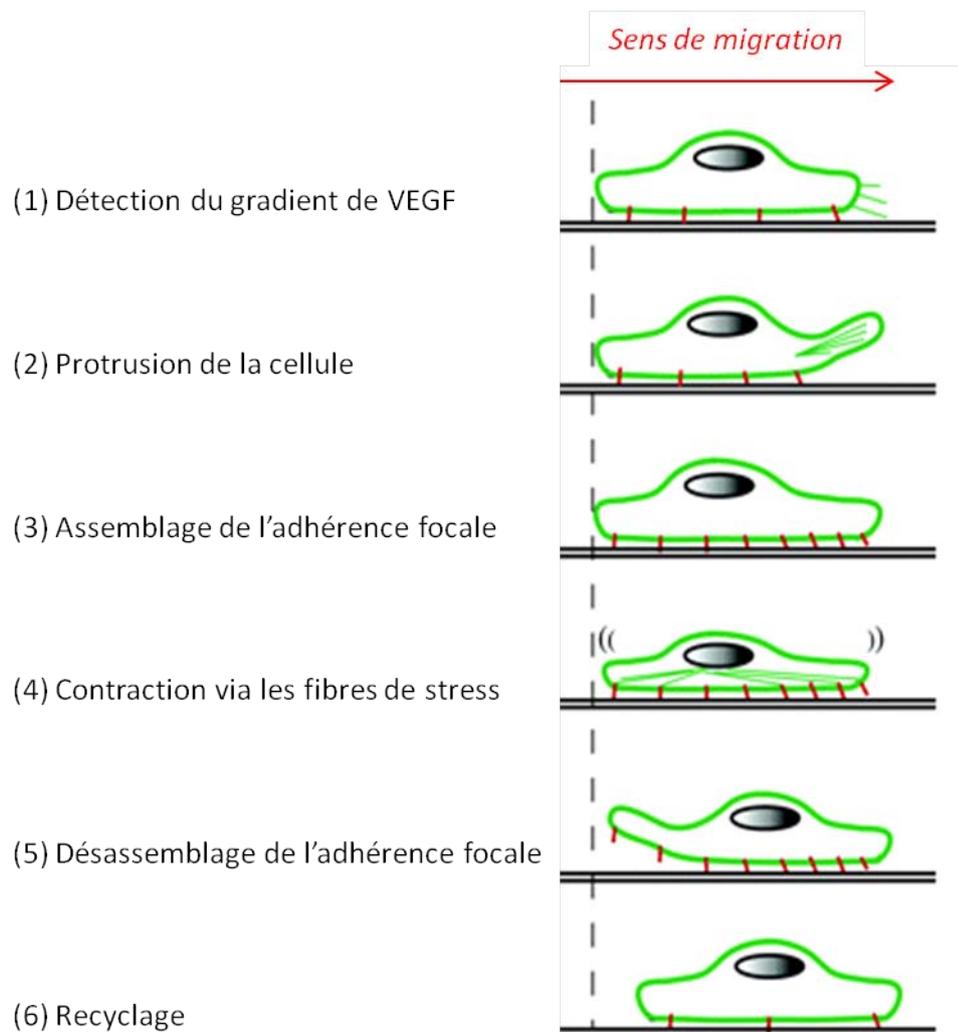


Figure 10: Etapes de la migration d'une cellule endothéliale. La migration d'une cellule endothéliale peut être divisée en six étapes : elle débute par la détection de l'environnement de la cellule suivie d'une extension cellulaire ou protrusion, l'attachement des protrusions au point focal d'adhérence (3) la contraction de la cellule impliquant les fibres de stress, permet son mouvement vers l'avant (4) le relâchement arrière des fibres de stress permet les forces de traction (5) et le recyclage des composants d'adhérence (6). (D'après Lamalice et al., 2007).

La migration des CE requiert l'activation de diverses voies de signalisation. Ce processus essentiel à l'angiogenèse peut être mimé *in vitro* en chambre de Boyden ou en cicatrice (wound healing). Pour cela, les cellules sontensemencées à forte confluence et une « brèche » est réalisée à l'aide d'un dispositif appelé « wound maker ». La migration des cellules dans la brèche est ensuite suivie grâce à l'Incucyte.

4.1.3) L'adhérence cellulaire

Suite au stimulus angiogénique, les connexions permettant les jonctions cellule-cellule ou cellule-matrice sont perturbées, ce qui augmente la motilité de la cellule. En effet, la migration correspond à la succession alternée d'établissement et de rupture de contact entre

cellules et matrices. Ainsi, l'adhérence cellulaire est essentielle à l'angiogenèse et est dépendante de protéines dont les intégrines et les cadhérines.

Les **intégrines** sont des récepteurs membranaires composés de trois domaines : un domaine intracellulaire qui interagit avec le cytosquelette (actine), un domaine transmembranaire, et un domaine extracellulaire.

Parmi les intégrines endothéliales, l'intégrine $\alpha v \beta 3$ a un rôle critique dans l'angiogenèse. D'abord considérée comme un récepteur exclusif à la vitronectine, cette intégrine lie par sa séquence adhésive RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) plusieurs protéines matricielles dont la vitronectine, la fibronectine, la laminine, le fibrinogène et la thrombospondine (Aguzzi et al., 2010).

Il a été montré que l'intégrine $\alpha v \beta 3$ est préférentiellement exprimée dans les CE intervenant dans l'angiogenèse (Brooks et al., 1994). Elle permet la transmission de signaux intracellulaires aboutissant à la prolifération et à la motilité cellulaire.

L'expérience d'adhérence est reproduite par dépôt des cellules sur différentes matrices telles que des matrices de collagène, fibronectine et vitronectine.

L'adhérence entre les CE est médiée par deux types principaux de structures adhésives appelées les jonctions serrées et les jonctions adhérentes. Ces dernières font intervenir les **cadhérines**, des glycoprotéines exprimées à la surface cellulaire. Les cadhérines se lient directement à la β -caténine qui se lie à l' α -caténine, une protéine liant l'actine (*figure 11*). La VE-cadhérine régule la fonction du VEGF-R et permet la régulation de la perméabilité des cellules endothéliales, la migration et l'assemblage des nouveaux vaisseaux (Vestweber, 2008). Elle participe aussi à la formation de la lumière vasculaire, fonction abordée plus tôt.

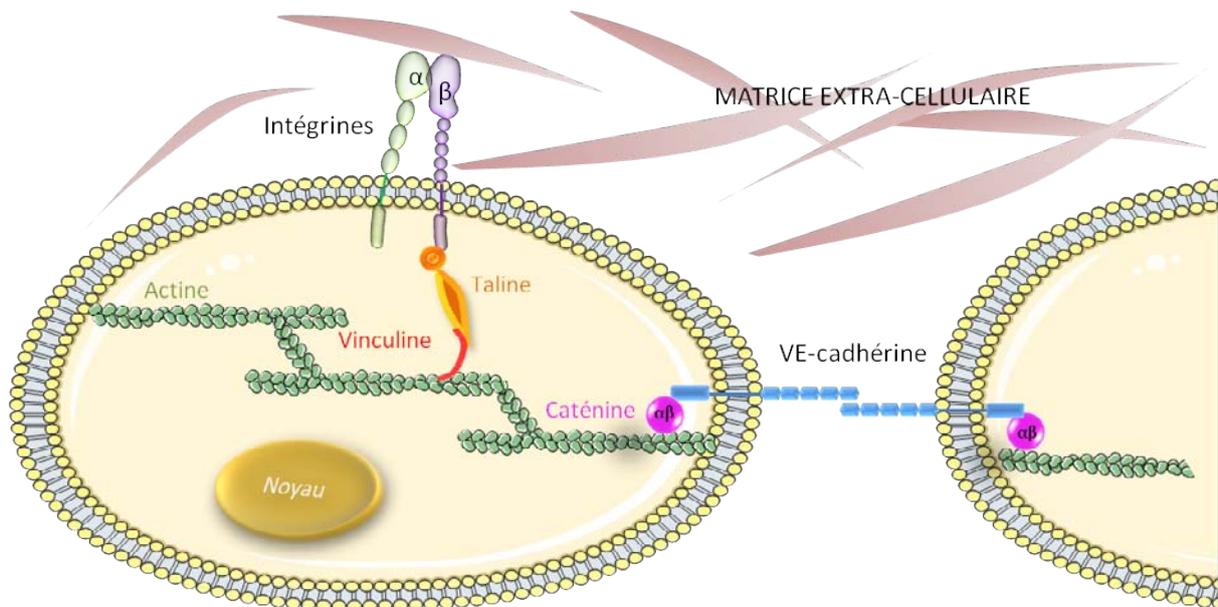


Figure 11: Jonctions entre cellules endothéliales et adhésion focale. La VE-cadhérine forme des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales et les intégrines permettent l'adhérence des cellules à la matrice extra-cellulaire. (Crée à partir de Servier Medical Art).

Des expériences telles que la tubulogénèse font intervenir l'adhérence cellule-matrice ainsi que l'adhérence cellule-cellule.

4.1.4) La tubulogénèse

La formation de tubes *in vitro* ou tubulogénèse est un processus qui réplique des étapes essentielles à la formation d'un capillaire *in vivo*, incluant l'adhérence, la migration, l'alignement des cellules et la formation de tubes. Cette expérience est réalisée par le dépôt de cellules endothéliales sur une membrane basale reconstituée telle que le matrigel (Arnaoutova et al., 2009).

Le test de tubulogénèse peut être également reproduit sur d'autres matrices telles que le collagène de type IV, qui est un des constituants de la lame basale et des cellules musculaires lisses.

Le test de tubulogénèse a été utilisé pour la détermination de l'activité pro-angiogénique ou anti-angiogénique de facteurs, la description des voies de signalisation et l'identification de gènes régulant l'angiogénèse en caractérisant les progéniteurs cellulaires. Pour cela, des molécules peuvent être ajoutées au milieu, transfectées dans les CE ou encore éteintes par ARN interférent (ARNi) (Arnaoutova et Kleinman, 2010).

1.2) Modèle d'angiogenèse *ex vivo* : les anneaux aortiques

L'angiogenèse peut être étudiée *ex vivo* par la culture d'anneaux aortiques de rat dans un gel de collagène ou matrigel (Bonanno et Nicosia, 1992). Par la suite, des cultures d'anneaux aortiques de souris et de poussin ont été développées.

Contrairement aux explants d'aorte de rats, les anneaux aortiques de souris sont incapables de produire spontanément une réponse angiogénique sans sérum. Cependant, ces anneaux répondent aux stimulations du VEGF ou du FGF-2 en générant un réseau de néo-vaisseaux de manière dose-dépendante. Les réponses au FGF-2 étant plus importantes que celles induites par le VEGF. La vitesse et l'ampleur des bourgeonnements aortiques chez la souris dépendent du fond génétique de l'animal, de l'âge ainsi que des facteurs utilisés. Un des intérêts majeurs de l'utilisation d'aorte de souris par rapport aux aortes de rat est l'importance de la banque de souris transgéniques à disposition. Par exemple, l'utilisation de ce modèle chez la souris Tie-GFP qui génère des néo-vaisseaux fluoresçant dans le vert, a permis de confirmer l'identité des cellules migrantes (Zhu et al., 2003).

La culture de crosse aortique de poussin a été initialement développée dans le but spécifique de tester le thalidomide, car il a été montré que cet inhibiteur a des effets forts sur l'angiogenèse dans des embryons de poulet. Ce test permet d'éviter l'utilisation des animaux de laboratoire, est rapide avec un temps de test court de 1-3 jours, et peut être effectuée dans un milieu sans sérum. Des facteurs de croissance stimulants tels que le FGF-2 ou des inhibiteurs tels que l'endostatine, peuvent être ajoutés au milieu pour influencer les bourgeonnements émanant des anneaux aortiques (Auerbach et al., 2003).

1.3) La rétine de souris

Le développement et la croissance des vaisseaux sont critiques pour la fonction de la rétine. La vascularisation de la rétine est initiée dans une période néonatale précoce chez l'humain puisqu'elle est repérée pendant le quatrième mois de gestation (Provis, 2001). En contraste, la rétine des mammifères non primates est avasculaire à la naissance. Par exemple chez les souris, les vaisseaux rétiens émergent des nerfs optiques immédiatement après la naissance durant la première semaine postnatale. Ce processus débute par la prolifération des cellules endothéliales et des péricytes, puis par leur migration le long des astrocytes pour former le

plexus primaire au cinquième jour post-natal (P5) (Dorrell et Friedlander, 2006). Le bourgeonnement guidé par les tip-cells conduit à la formation d'un second plexus en profondeur à P8. Ces processus angiogéniques qui sont observés par marquage du réseau vasculaire de la rétine de souris avec l'isolectine B4, peuvent être influencés par l'injection de molécules aux souris, par voie intra-péritonéale (figure 12).

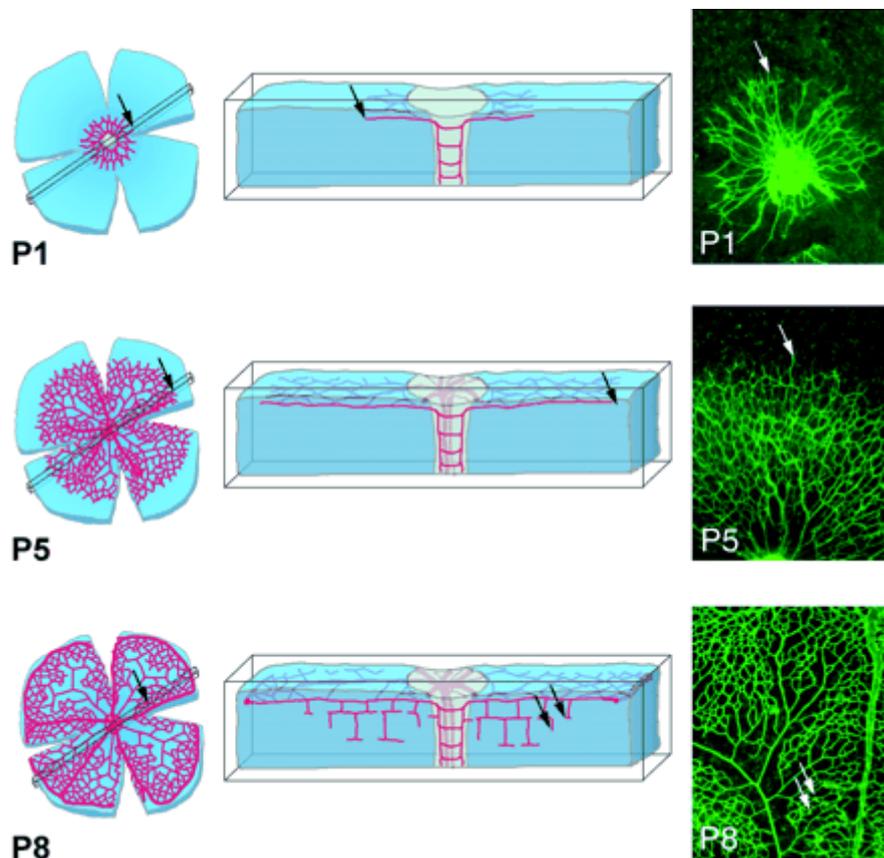


Figure 12: Représentation schématique du développement de la rétine. Les schémas et images confocales représentent la formation du plexus primaire guidée par les tip cells vers la périphérie (P1-P5) puis vers les couches plus profondes (P8). Les bourgeonnements sont désignés par les flèches blanches. (D'après Gerhardt et al., 2003).

Ce modèle est classiquement utilisé pour étudier la formation des vaisseaux ainsi que leur maturation et leur spécification. De plus, les rétines peuvent être marquées *in toto* ce qui rend possible la visualisation du réseau vasculaire au cours du développement en 2D.

Les tests *in vitro* ou *ex vivo* sont des premiers tests essentiels à la validation d'un composé (pro ou anti-angiogénique) mais de part l'inexistence des interactions cellulaires et moléculaires avec les autres tissus de l'organisme, ne reflètent pas toujours ce qui se passe *in vivo*. L'intérêt de modèles *ex vivo* tels que les anneaux aortiques est qu'ils font intervenir des cellules murales, lesquelles sont connues pour avoir un rôle central dans la stabilité des

vaisseaux sanguins nouvellement générés. Aussi, plusieurs essais *in vivo* ont été mis au point et permettent une évaluation plus réaliste de la réponse angiogénique.

1.4) La membrane chorio-allantoïdienne de l'embryon de poulet

La CAM (membrane chorio-allantoïdienne) est un tissu richement vascularisé qui tapisse entièrement l'intérieur de la coquille de l'œuf. Elle se forme au stade embryonnaire E5 par la fusion du feuillet mésodermique de la membrane allantoïdienne et de la couche mésodermique du chorion. C'est un organe qui permet la **respiration et le développement de l'embryon** en assurant le transport d'oxygène et de calcium indispensable pour la formation des os et de la coquille (Tuan, 1987). Cette membrane qui peut être comparée au placenta des mammifères est **hautement vascularisée**. Elle est constituée de plusieurs couches :

- une couche allantoïque, la face inférieure de la CAM à proximité de l'embryon
- le mésoderme, la zone interne de la CAM, est constitué d'éléments du tissu conjonctif : des vaisseaux, artérioles, veinules connectés à la circulation de l'embryon, des vaisseaux lymphatiques, des fibroblastes et de la MEC.
- le plexus capillaire, directement en contact avec la face externe du stroma de la CAM, est un réseau vasculaire très dense irrigué par les vaisseaux du mésoderme.
- l'épithélium chorionique, en surface de la CAM, repose sur une membrane basale en contact direct avec le plexus capillaire.

Ainsi, la CAM constitue un modèle intéressant afin d'étudier le développement vasculaire et l'utilisation de ce modèle présente de nombreux avantages. Le réseau vasculaire est d'accès et de manipulation faciles permettant ainsi diverses études *in vivo*:

- l'hémodynamique,
- la perméabilité des micro-vaisseaux,
- l'analyse des cellules vasculaires et leur interaction des tissus transplantés ou des tumeurs,
- L'évaluation des effets de facteurs de croissance et de biomatériaux sur l'angiogénèse.

La caractéristique la plus avantageuse est la possibilité d'entreprendre des études par microscopie intra-vitale pour observer le remodelage vasculaire.

Au cours des trois dernières décennies, elle était utilisée principalement pour tester l'influence de facteurs pro ou anti-angiogéniques sur le développement vasculaire. Il a été montré que parmi plusieurs facteurs testés (Angiogénine, PDGF-BB et FGF-2) seul le VEGF165 induit une croissance des vaisseaux sanguins ainsi qu'une émergence de nouveaux vaisseaux à partir des artérioles pré-capillaires. Le VEGF réduit aussi les espaces inter-capillaires, ce qui est un indicateur de l'angiogénèse intussusceptive (*figure 13*) (Hagedorn et

al., 2004). Le PDGF-BB induit un épaissement de la CAM dû à la production de MEC ainsi que la prolifération ou la migration des fibrocytes (Wilting et al., 1992). L'effet anti-angiogénique de plusieurs peptides modifiés dérivés de la partie C-Terminale de la chimiokine PF4 (Platelet Factor 4), a aussi été testé sur la CAM.

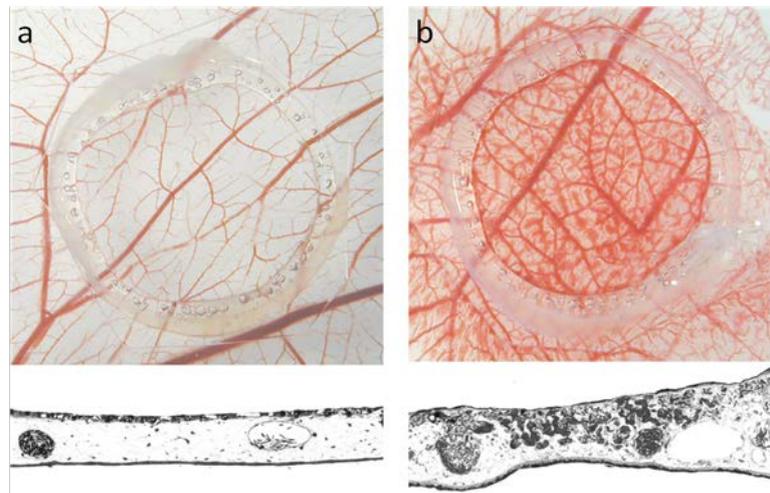


Figure 13: Biomicroscopie d'une CAM présentant l'effet pro-angiogénique du VEGF. Coupes transversales des CAM. CAM contrôles (A) et CAM traitée au VEGF (B). (D'après Hagedorn et al. 2004).

1.5) Modèle du poisson zèbre

Le poisson zèbre comme modèle d'étude présente de nombreux avantages tels que la facilité d'obtenir des descendants car ces poissons sont très fertiles. Leur développement embryonnaire est externe et rapide. De plus, la transparence des embryons de poisson zèbre permet l'observation des organes et donc le suivi du développement de l'animal. Il est donc possible de visualiser les ARNm en réalisant des hybridations *in situ in toto* ou de suivre la progression tumorale de cellules xéno greffées. Enfin, le développement de méthodes génétiques a permis la génération de mutants.

Dans le cadre de notre étude, nous nous intéressons à la **vascularisation du poisson zèbre**.

La mise en place du réseau vasculaire du poisson, tout comme pour les autres vertébrés, implique la différenciation d'hémangioblastes provenant du mésoderme en angioblastes puis en cellules endothéliales.

Approximativement 12h post-fécondation, les cellules du mésoderme latéral commencent à exprimer des marqueurs des hémangioblastes tels que SCL/Tal-1 et Flk1. Ces bandes mésodermes convergent jusqu'à atteindre l'embryon, entre les somites et le sac vitellin pour former la masse cellulaire intermédiaire (ICM). 24h post fécondation, une simple

boucle circulatoire est formée par l'aorte dorsale et la veine axiale. Le sang circule à travers le sac vitellin via les canaux de Cuvier qui sont la réunion des veines cardinales antérieures et postérieures et les veines hépatiques (*figure 14*).

72h après fécondation, une vascularisation fonctionnelle s'est développée. Celle-ci comprend les vaisseaux majeurs du tronc, les bourgeonnements angiogéniques tels que les **vaisseaux subintestinaux (SIVs)**. Les vaisseaux dans la queue postérieure, cependant, sont toujours en différenciation et expriment SCL/Tal-1 à 72 h (Serbedzija et al., 1999).

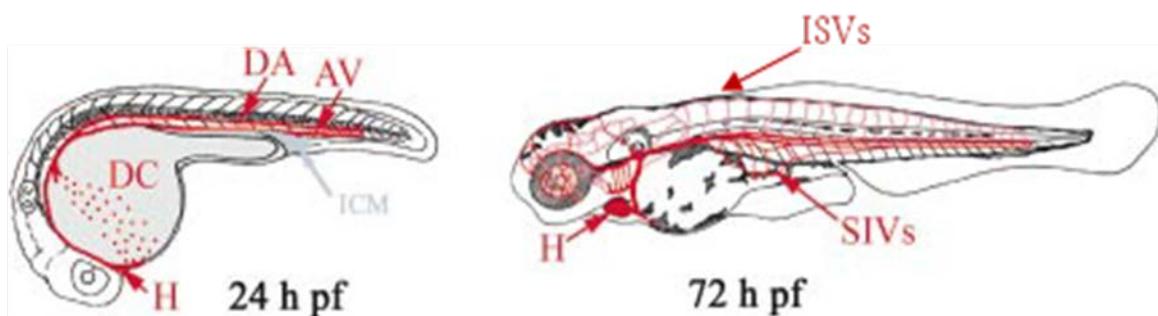


Figure 14 : Développement de la vascularisation chez le poisson zèbre. A 24h, l'aorte dorsale (DA) et la veine axiale (AV) sont formées. Les cellules sanguines circulent sur le sac vitellin via le canal de Cuvier (DC). Les vaisseaux angiogéniques : les vaisseaux inter-somitiques (ISVs) et les vaisseaux sub-intestinaux (SIVs) sont formés à 72h. masse cellulaire intermédiaire (ICM), cœur (H). (*Modifié d'après Serbedzija et al., 1999*).

La mise en place de la vascularisation des poissons zèbres est comparable à celle observée chez les mammifères et est aussi dépendante du VEGF (Serbedzija et al., 1999).

Nous disposons de **poissons transgéniques Tg(flia :EGFP)y1** (*figure 15*). Ces poissons ont été générés et expriment la GFP sous le contrôle de la séquence promotrice appelée Fli. Celle-ci permet la transcription des protéines exclusivement dans l'endothélium. Ainsi, l'expression de la protéine GFP est entraînée dans les vaisseaux et les poissons transgéniques Tg(flia :EGFP)y1 affichent l'expression uniforme et persistante de la protéine GFP dans tout le système vasculaire. Ces poissons transgéniques ont un certain nombre d'applications potentielles dont l'identification de molécules pro ou anti-angiogéniques lors d'un criblage de médicaments à haut débit. Ainsi les effets des morpholinos ou des inhibiteurs sur les vaisseaux peuvent être directement observés *in vivo*.

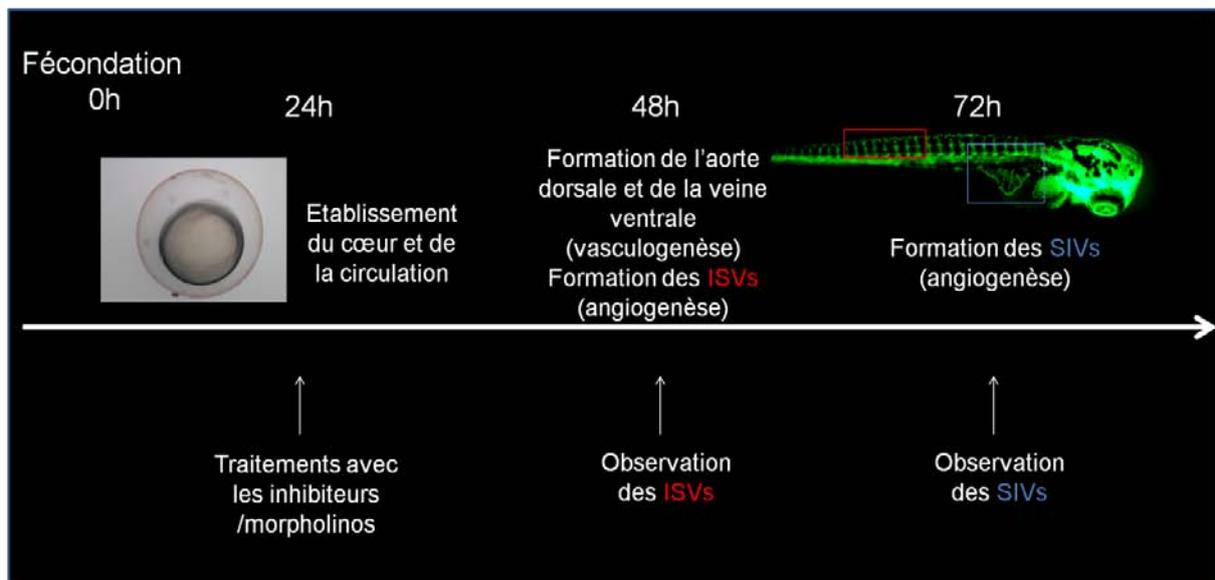


Figure 15: Protocole d'étude du développement vasculaire du poisson zèbre. Après 24h de développement, les poissons zèbres sont traités avec des inhibiteurs ou des morpholinos. Les vaisseaux intersomitiques (ISVs) et les vaisseaux sub-intestinaux (SIVs) sont observés.

Dans ces premières pages l'angiogenèse a été abordée dans un contexte physiologique, mais ce processus intervient aussi dans des maladies. Dans des cas d'infarctus du myocarde, d'attaque cérébrale ou d'ischémie des membres, l'angiogenèse permet de remplacer ou de compléter les vaisseaux obstrués ou endommagés. Ainsi, les organes et les tissus qui sont à nouveau alimentés et oxygénés survivent et les fonctions sont préservées. Elle est alors particulièrement utile pour empêcher la mort de zones, parfois vitales, de l'organisme.

Cependant, l'angiogenèse peut être aussi délétère comme dans le cas du cancer où elle permet la croissance tumorale (Folkman et al., 1971).

II. L'angiogenèse tumorale

Le cancer est l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Il tient son nom d'Hippocrate qui avait comparé une tumeur à un crabe (460-377 avant JC): « *la tumeur apparaît à la surface du corps et se colore progressivement comme un crabe émergeant du sable ; en un second temps les vaisseaux sanguins sont dilatés, les lymphatiques engorgés et irradiant de la masse simulent les pattes et surtout les pinces auxquelles la douleur fait également référence* ».

Une tumeur est caractérisée par un accroissement excessif et non coordonné de cellules anormales. Elle est induite par un stimulus, d'origine héréditaire ou associé à des facteurs environnementaux tels que le tabagisme et l'obésité, qui conduit à l'activation de certains oncogènes tels que Ras ou BCl, ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que P53 ou BAC. Ces altérations génétiques perturbent l'équilibre entre stimulation et inhibition de la prolifération cellulaire.

Au-delà d'une certaine taille, les foyers tumoraux nécessitent une adaptation de leur micro-environnement (ou stroma). Le stroma est constitué de cellules dites non tumorales, comprenant les cellules du tissu hôte, des cellules inflammatoires ou immunitaires, des CE et péri-vasculaires ainsi que des fibroblastes. Les cancers sont fortement influencés par les signaux émanant du stroma. Si celui-ci est permissif, il sera le siège d'une néovascularisation permettant l'accroissement tumoral.

Il y a plusieurs siècles, une association entre tumeurs et vaisseaux a été mise en évidence. A la fin du XIX^{ème} siècle, la présence d'une vascularisation importante dans les tumeurs était détectée par R. Virchow. En 1927, Lewis décrit que l'environnement influence la croissance tumorale. En 1971, Judah Folkman avance l'hypothèse que pour croître, le tissu cancéreux comme n'importe quel autre tissu nécessite de l'oxygène et des nutriments. Ces derniers étant véhiculés par les vaisseaux, si elle n'est pas vascularisée, une tumeur ne peut pas croître au-delà d'un certain volume (1 à 2mm³) (Folkman, 1971).

Lors de processus pathologiques tels que le cancer, l'angiogenèse physiologique (par bourgeonnement ou intussusception) va être mimée afin de subvenir aux besoins métaboliques de la tumeur. Cette angiogenèse tumorale aboutit à une architecture vasculaire immature,

plastique, permettant la croissance continue des vaisseaux sanguins et par conséquent le développement tumoral et la propagation de métastases.

D'autres mécanismes de recrutement de vaisseaux par les tumeurs ont été identifiés (Auguste et al., 2005) :

- **Vaisseau mosaïque** : les cellules tumorales qui passent dans la circulation sanguine peuvent rester bloquées temporairement dans le mur des capillaires. Le vaisseau ainsi formé est constitué de cellules tumorales et de cellules endothéliales (Carmeliet and Jain, 2000).
- **Mimétisme vasculaire** : les cellules tumorales sont en mesure de produire des canaux vascularisés, avec une membrane basale, ne comportant aucune cellule endothéliale (Folberg et Maniotis, 2004; Maniotis et al., 1999). Ce mécanisme d'abord décrit dans le mélanome, a été identifié dans le cancer du sein, poumon, prostate et carcinome ovarien (Passalidou et al., 2002; Sharma et al., 2002; Shirakawa et al., 2002; Sood et al., 2001).
- **La vasculogénèse** permet le recrutement de cellules précurseur circulantes : des cellules endothéliales progénitrices peuvent être mobilisées à partir de la moelle osseuse, être transportées par la circulation sanguine et être incorporées dans la membrane des vaisseaux en formation.
- La **cooption vasculaire** est la condition par laquelle une tumeur croit dans un environnement très vascularisé jusqu'à englober les vaisseaux pré-existants (Holash et al. 1999).

1) Mécanismes de l'angiogénèse tumorale

L'angiogénèse a un rôle clé dans la croissance tumorale car elle permet la formation d'un réseau vasculaire au sein d'une tumeur (Roskoski, 2007).

Les mécanismes moléculaires des différentes modes d'angiogénèse sont complexes, puisqu'ils mettent en jeu des signaux extra- et/ou intracellulaires. Ils peuvent être d'origine :

- **épigénétique** : l'angiogénèse est provoquée par l'hypoxie, l'hyperglycémie, l'acidification du milieu, l'inflammation / des cytokines, des hormones sexuelles, des facteurs de croissance ou encore des chimiokines.

- **génétique** : l'angiogenèse est provoquée par la mutation de p53, l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (VHL, PTEN) ou l'activation d'oncogènes (Ras, Src, HER1 et HER2).

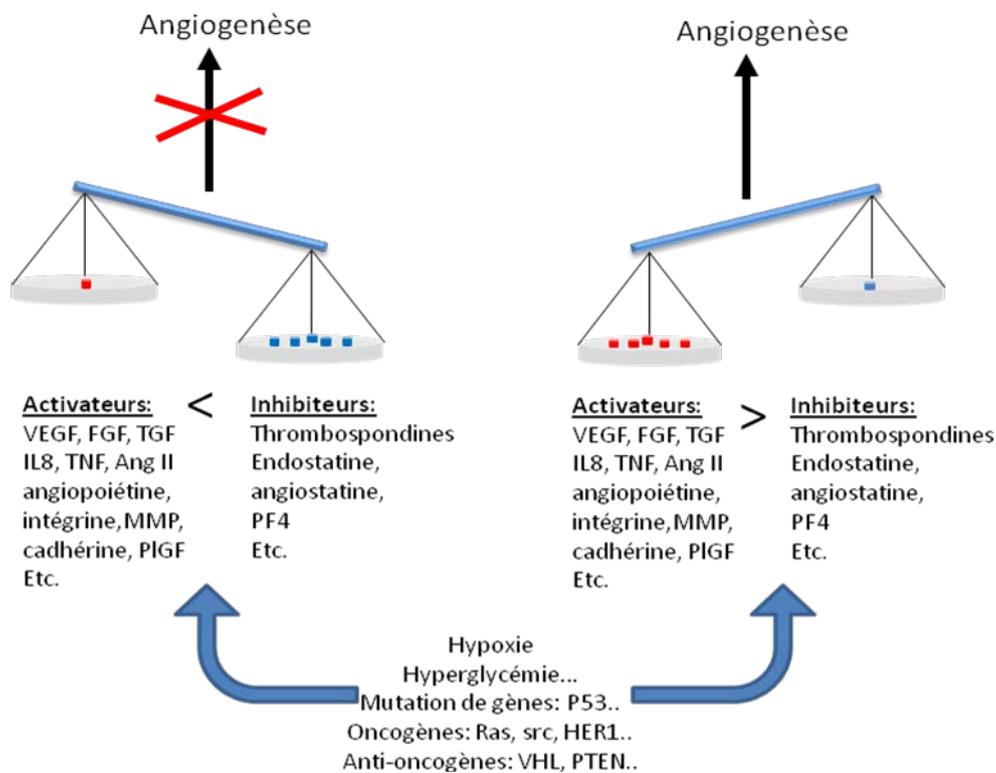


Figure 16: Balance des activateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. La régulation moléculaire du switch angiogénique est à l'image d'une balance comptant sur chacun des plateaux des facteurs activateurs ou inhibiteurs de l'angiogenèse. Un déséquilibre de la balance induit par divers signaux tels que l'ischémie, des oncogènes, et des facteurs de croissance entraîne une angiogenèse. (Adapté d'après Bikfalvi 2003).

Dans le cas de l'hypoxie, les cellules cancéreuses du centre de la tumeur se retrouvent éloignées des vaisseaux périphériques. Ce déficit en apport sanguin d'oxygène (**hypoxie**) et en nutriments ainsi qu'une accumulation de métabolites toxiques dans les cellules (Shannon et al., 2003). Celles-ci soumises à des conditions ischémiques modifient alors leur métabolisme et déclenchent des programmes permettant leur réapprovisionnement : soit en modifiant leur potentiel invasif (sécrétion de métalloprotéases, transition épithélio-mésenchymateuse), soit en induisant l'angiogenèse (Bergers et Hanahan, 2008). Pour ceci, les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF.

La résultante de ces altérations est un déséquilibre de la balance entre les **facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques** sécrétés par les cellules tumorales ou les cellules associées (figure 16).

L'augmentation du VEGF permet une augmentation de la perméabilité des CE via la stimulation du transport vésiculaires entre les membranes luminales et abluminales (Kohn et al., 1992), la perte de jonction adhérentes entre CE induite par l'activation de la MAP kinase (Esser et al., 1998; Kevil et al., 1998; Lal et al., 2001) et l'activation de la voie PKB/Akt, MAPK, eNOS dans les HUVEC (Lal et al., 2001) (*figure 17*). De plus récentes études démontrent l'implication de l'apoptose des cellules endothéliales dans la perméabilité vasculaire (Childs et al., 2007). La perméabilité vasculaire augmentée peut ainsi permettre l'extravasation des protéines plasmatiques et la formation d'une MEC favorable à la migration des cellules stromales et endothéliales.

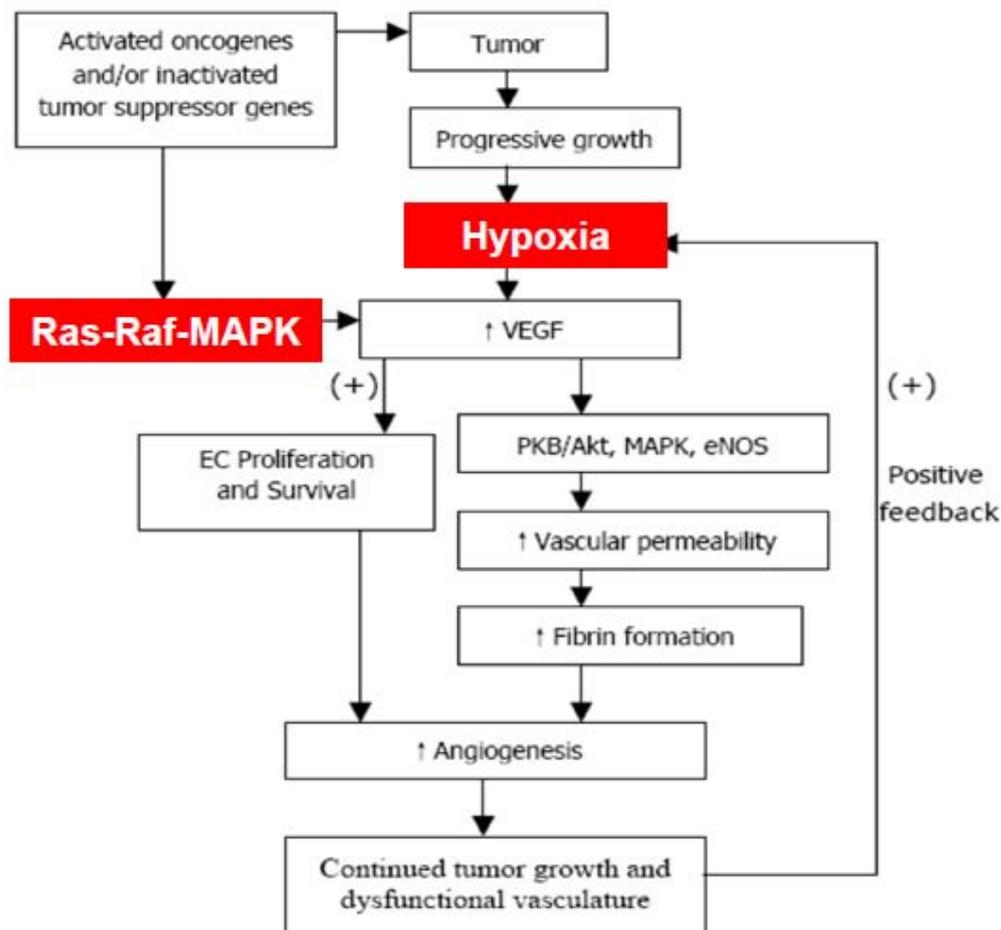


Figure 17: Mécanismes déclenchant l'angiogenèse tumorale : L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur et/ou l'activation de facteurs oncogènes déclenchent l'angiogenèse tumorale via l'Hypoxie ou l'activation de la voie Ras-Raf-MAPK (D'après Gupta et Qin, 2003).

En plus de lui permettre un apport vital, les nouveaux vaisseaux vont permettre l'évacuation des déchets métaboliques de la tumeur (Papetti et Herman, 2002) et fournir aux cellules tumorales une voie directe de dissémination systémique. Celles-ci vont alors envahir les vaisseaux et former des tumeurs secondaires dans d'autres organes, les métastases (*figure 18*).



Figure 18: Processus de l'angiogenèse tumorale et de la diffusion métastatique. Source Image tirée des laboratoires Roche: (<http://www.doctissimo.fr/html/dossiers/cancer/articles/9068-cancer-medicament-angiogene.htm>).

Les **métastases** sont les premières causes de mortalité de la plupart des patients atteints de cancer. Afin de métastaser, les cellules doivent acquérir un phénotype invasif permis par des interactions entre cellules cancéreuses et microenvironnement tumoral. Ces interactions vont permettre les principales étapes de la cascade métastatique :

- la migration de la cellule du site primaire.
- l'intravasation dans les vaisseaux lymphatiques ou le flux sanguin, où les cellules doivent résister aux attaques du système immunitaire.
- l'arrêt et l'extravasation des cellules vers un nouveau site.

Dans la plupart des cascades métastatiques, des changements dans l'adhérence de la cellule tumorale aux cellules stromales ou à la MEC ainsi que la dégradation protéolytique de la MEC sont nécessaires à l'invasion.

2) Le glioblastome

2.1) Classification

Le glioblastome ou glioblastome multiforme (GBM) est un gliome de haut grade (grade IV). Le GBM est dérivé d'un type de cellules gliales, les astrocytes mais est composé de divers types cellulaires. Les tumeurs cérébrales varient en fonction de leur taille, leur localisation et leur agressivité. Elles sont répertoriées par l'Organisation Mondiale de la Santé selon des critères d'origine cellulaire et leur malignité. Ainsi, les gliomes malins, tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes, sont classés en quatre grades cliniques (*tableau 1*).

Grade	Astrocytome	Oligodendrogliome	Gliome mixte
I	A. pilocytique		
II	Astrocytome	Oligodendrogliome	Oligoastrocytome
III	A. anaplasique	O. anaplasique	OA anaplasique
IV	Glioblastome		

Tableau 1: Classification des gliomes selon l'OMS. O. : oligodendrogliome, A. : astrocytome et OA oligoastrocytome..

2.2) Epidémiologie et Etiologie

C'est la tumeur primitive du cerveau la plus **fréquente** et la plus **agressive avec un mauvais pronostic** de survie médiane généralement inférieur à 1an. Le GBM survient dans 70% des cas entre 45 et 70 ans avec une incidence d'environ 4 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. En plus de l'âge, l'augmentation de l'incidence est liée à de nombreux facteurs tels que la situation géographique possiblement liée à l'appartenance ethnique, l'existence d'un syndrome de prédisposition génétique, certains polymorphismes génétiques et une radiothérapie encéphalique (Baldi et al., 2010).

2.3) La vascularisation des glioblastomes

La vascularisation des gliomes apparaît étroitement corrélée au degré de malignité et au pronostic (Leon et al., 1996). Ainsi, les GBM font partie des tumeurs les plus **vascularisées** observées chez l'humain et sont caractérisées par la prolifération intense des cellules endothéliales (Jain et al., 2007). En effet dans les GBM, 12,5% des CE sont en prolifération ce qui suggère que les vaisseaux se renouvèlent 40 fois plus vite que les CE du cerveau sain (Kleihues et al., 2002).

De part la croissance rapide du GBM, la plupart des cellules tumorales sont en relative hypoxie. Elles déclenchent alors de multiples mécanismes permettant la vascularisation tumorale incluant la cooption vasculaire, l'angiogenèse classique et la vasculogenèse. D'autres mécanismes de vascularisation, ont été identifiés dans le GBM: le mimétisme vasculaire et la transdifférenciation des cellules du GBM en CE (Hardee et al. 2012).

L'hypoxie est considérée comme élément clé de l'induction de l'angiogenèse dans les GBM et mène à une stabilisation intracellulaire de HIF1 α , le régulateur principal de l'hypoxie. L'accumulation de HIF1 α mène à une activation transcriptionnelle de plusieurs gènes régulés dont certains contrôlent l'angiogenèse (VEGF et angiopoïétine) (Lund et al., 2004; Minchenko et al., 1994; Shweiki et al., 1992), le métabolisme cellulaire (anhydrase carbonique, lactate déshydrogénase), la survie et l'apoptose (la protéine pro-apoptotique Bnip3L) (Krick et al., 2005), et la migration (le récepteur aux chimiokines de type 4 ou CXCR4, c-met) (Eckerich et al., 2007; Zagzag et al., 2006).

Le VEGF, un des gènes principaux induit par le facteur de transcription HIF1 α est produit puis sécrété par les cellules tumorales dans les régions hypoxiques selon un gradient de concentration (Zagzag et al., 2000). Il va ensuite se fixer sur ses récepteurs exprimés par les CE (Veikkola et Alitalo, 1999).

Néanmoins, des études ont montré que l'angiogenèse n'est pas exclusivement dépendante de l'hypoxie. Par exemple, des marquages de coupes de divers types tumoraux exposent une surexpression du VEGF en absence de marqueurs de l'hypoxie (Jubb et al., 2004). Il a été aussi décrit que des mutations génétiques de gènes encodant PDGFR, EGFR, p53, RB1, VHL et PTEN stabilisent HIF1 α indépendamment de l'hypoxie (Kaur et al., 2004; Ohgaki et al., 2004; Parliament et al., 2000; Semenza, 2010; Zagzag et al., 2000).

D'autres facteurs tels que l'EGF (Goldman et al., 1993), le TGF α (Koochekpour et al., 1996), le HGF/SF (Moriyama et al., 1998) et l'interleukine-1 (Valter et al., 1999) provoquent également la surexpression du VEGF par les cellules de gliomes *in vitro*.

2.4) la thérapie anti-angiogénique

Les traitements anti-angiogéniques jouent déjà un rôle important dans la prise en charge des glioblastomes en récurrence. Des régulateurs positifs de l'angiogénèse en particulier le VEGF-A a été ciblé afin de réduire la croissance tumorale en privant la tumeur d'oxygène et de nutriments. L'Avastin (Bevacizumab) est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie sélectivement sur le VEGF humain et en neutralise l'activité biologique (Presta et al., 1997) (Ferrara et al., 2005).

En 2007, une étude réalisée sur deux cohortes de patients (de 23 et 12 patients) démontre que la combinaison de l'Avastin avec l'Irinotecan améliore le taux de survie sans progression des GBM récurrents et est modérément toxique (Vredenburgh et al., 2007).

L'inhibition du VEGF est une thérapie anticancéreuse efficace. Cependant, l'optimisation et la combinaison des inhibiteurs de l'angiogénèse avec les thérapies conventionnelles restent à établir. D'importants essais cliniques randomisés sont en cours pour étudier les combinaisons en première ligne de traitement.

2.5) Les modèles animaux

Une meilleure compréhension de la vascularisation des GBM est nécessaire pour optimiser les thérapies anti-angiogéniques, lesquelles ne sont efficaces que de façon transitoire. Ainsi, la modélisation de GBM a permis de tester les potentielles drogues et de cibler des facteurs impliqués dans l'angiogénèse ou la diffusion. Mais, alors que le GBM montre une grande hétérogénéité entre les patients, les modèles ont un phénotype tumoral reproductible qui ne correspond pas à la réalité clinique.

Il existe divers types de modèle animaux qui permettent de simuler chez des animaux des cancers observés chez l'humain. Parmi eux, les tumeurs greffées, les souris transgéniques qui développent des tumeurs et les tumeurs induites chimiquement.

Dans le cas des greffes de cellules tumorales chez l'animal, il existe un modèle syngénique, le gliome murin GL261. Le gliome GL261 est un gliome induit par le biais de l'implantation

intracrânienne de 20 pastilles méthylcholanthrène dans les cerveaux de souris (Ausman et al., 1970).

2.5.1) Modèle du glioblastome chez la souris immunodéficiente

L'utilisation de xéno greffes de cellules humaines chez l'animal est commune puisqu'elle offre la possibilité de tester de futurs traitements potentiels sur des cellules tumorales. De nombreuses cellules isolées à partir de GBM humain telles que les SF126, SF188, U87 et T98G peuvent être injectées en intracrânien ou en sous cutanée chez des souris immunodéficientes. Les GBM U87 font partie des tumeurs les plus implantées chez la souris. Une des caractéristiques de ces cellules est qu'elle comporte moins des anomalies chromosomiques que d'autres lignées cellulaires cancéreuses et cancers primaires (Mulholland et al., 2006) (tableau 2).

Délétions	Gène(s) dans la région délétée
6q16 (99-104Mb)	CCNC, SIM1
6q23-24 (135-143Mb)	MAP3K5, TNFAIP3, MAP7
8q21 (87-90Mb)	MMP16
10q11 (48-49Mb)	MAPK8
13q14-21 (47-62Mb)	RB1
19q13 (52-55Mb)	MEIS3

Tableau 2 : Régions de délétions caractérisant les cellules U87. CCNC (Cycline C), SIM-1 (single-minded homolog 1), MAP3K5 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5), TNFAIP3 (tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3), MAP7 (microtubule associated protein 7), MMP6 (matrix metalloproteinase 6), RB1 (retinoblastoma). (Modifié d'après Mulholland et al., 2006).

2.5.2) Glioblastome implanté sur la membrane chorio-allantoïdienne de poulet

La mise au point d'un modèle de GBM expérimental sur la CAM a permis de pallier à certains désavantages du modèle de tumeur chez la souris tels que le coût, la durée de la manipulation, l'accès restreint à la tumeur et les problèmes éthiques (Hagedorn et al., 2005).

Le modèle a été développé par implantation de cellules U87 sur la CAM à E10. Le deuxième jour après implantation, les tumeurs induisent un switch angiogénique puis se développent très rapidement. L'observation macroscopique de ces tumeurs montre que celles-ci présentent des zones de nécrose, d'angiogenèse, d'hémorragies ainsi que des oedèmes (figure 19). Ces

caractéristiques sont retrouvées dans des GBM humains sur le plan histologique (*Hagedorn et al., 2005*).

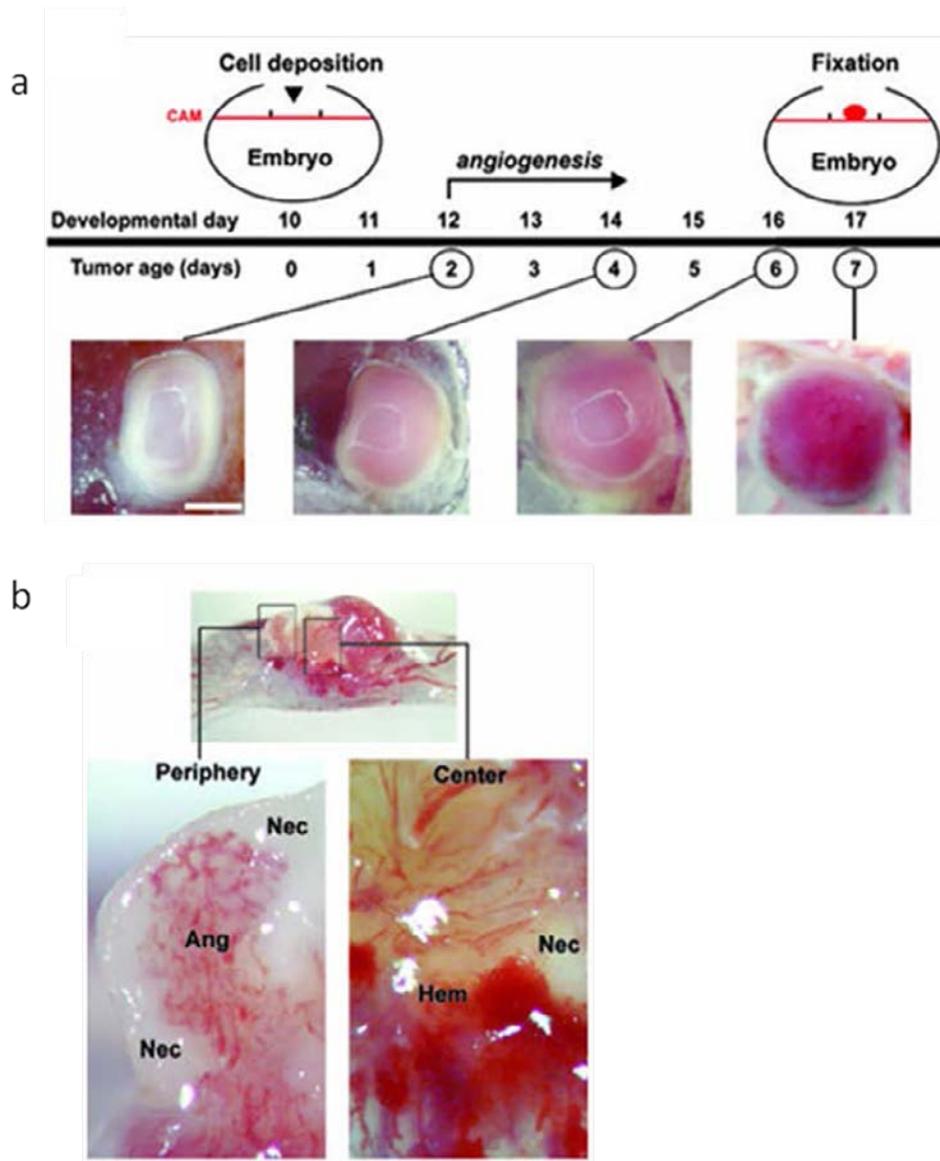


Figure 19 : Modélisation du GBM sur la CAM. Protocole d'implantation du GBM sur la CAM et suivi de l'évolution tumorale. Les cellules tumorales U87 sont déposées sur la CAM de l'embryon de poulet à J10. La croissance et l'angiogénèse de la tumeur peuvent être observées pendant 7 jours au bout desquels l'embryon est fixé (a). Zones du GBM grossies en périphérie et au centre de la tumeur (b). Nec : nécrose, Ang : zone angiogénique, Hem : zone hémorragiques. (*D'après Hagedorn et al. 2005*)

3) Le carcinome rénal à cellulaires claires

3.1) Classification des tumeurs rénales

Tout comme pour les tumeurs du SNC, il existe une classification histopathologique des tumeurs rénales. Celle-ci différencie les tumeurs retrouvées chez l'adulte de celles de l'enfant :

Tumeurs rénales épithéliales

- **Carcinome à cellules rénales**
- **Adénome**
- **Oncocytome**
- **Néphrome kystique**

Tumeurs rénales non épithéliales de l'adulte

- **Angiomyolipome**
- **Tumeurs à cellules juxtaglomérulaires**
- **Tumeurs conjonctives ou mésenchymateuse bénignes**
- **Tumeurs mésenchymateuses malignes ou sarcome**

Tumeurs rénales de l'enfant

- **Néphroblastome**

3.2) Epidémiologie et Etiologie

Le carcinome rénal à cellules claires (RCC) est le cancer du rein le plus répandu chez les adultes (85% des cas). L'incidence du RCC est dépendante de plusieurs facteurs tels que la géographie, le sexe et l'âge. Les facteurs de risque majeurs sont le tabagisme (identifié dans 10-20% des cas pour les femmes et 20-30% pour les hommes), l'obésité (contribue au développement de 30% des RCC en Europe et 40% aux Etats-Unis et au Canada) et l'hypertension (1,3-2% des RCC) (Shannon et al., 2009).

Certaines conditions pathologiques sont associées à une fréquence élevée de cancer du rein : la polykystose rénale, l'insuffisance rénale avec multikystose acquise chez l'hémodialysé chronique, le rein en fer à cheval et surtout la maladie de Von Hippel-Lindau (phacomatose associant hémangioblastome cérébelleux et angiome rétinien) qui est associée dans près de 2/3 des cas à des cancers multiples de rein et bilatéraux.

3.3) Aspects histopathologiques

Typiquement, le carcinome rénal à cellules claires est une tumeur rénale corticale caractérisé par des cellules épithéliales avec un cytoplasme clair (Cohen et al., 2007). Le cytoplasme clair résulte de l'accumulation de gouttelettes de glycogène, phospholipides et des lipides neutres en particulier l'ester de cholestérol. Ces cellules mutées proviennent du tube proximal et du cortex rénal. Tout comme l'organe sain, le carcinome rénal est bien vascularisé (*figure 20*).

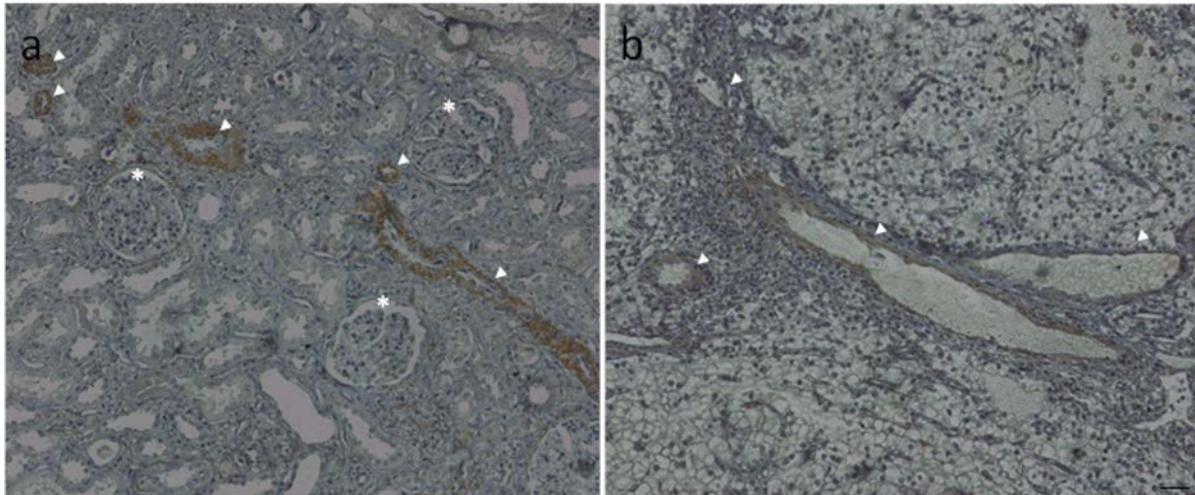


Figure 20: Histologie du RCC. Immuno-marquage des cellules murales par l' α -SMA et contre coloration à l'hématoxyline sur des coupes de rein sain humain (a) et de cancer rénal à cellules claires humain (b). Les flèches indiquent les vaisseaux et les étoiles, les glomérules. La barre de calibration indique 100 μ m.

3.4) Un cancer invasif

Divers facteurs pronostiques, tels que la taille de la tumeur, la différenciation sarcomatoïde, la marge infiltrante, l'invasion vasculaire sont utilisés pour déterminer l'évolution de la tumeur. Le stade de la tumeur qui prend en compte la taille de la tumeur et l'invasion est souvent utilisé comme référence. Dans le cas de tumeurs de stade I ou II, le cancer est uniquement localisé dans le rein. Les tumeurs dont le diamètre est supérieur à 7cm sont classées dans le Stade II. Les tumeurs qui s'étendent au-delà du fascia péri-rénal de Gérota, une couche de tissu qui encapsule la glande des reins et la surrénale, sont de Stade III. Ces tumeurs commencent à envahir aussi les vaisseaux sanguins tels que la veine cave. Les tumeurs de Stade IV s'étendent au-delà du fascia de Gérota et/ou le cancer s'est propagé à un ou plusieurs ganglions lymphatiques près du rein. En outre, le cancer peut s'être propagé à d'autres organes du corps, comme les poumons, le foie, le cerveau ou les os (*figure 21*).

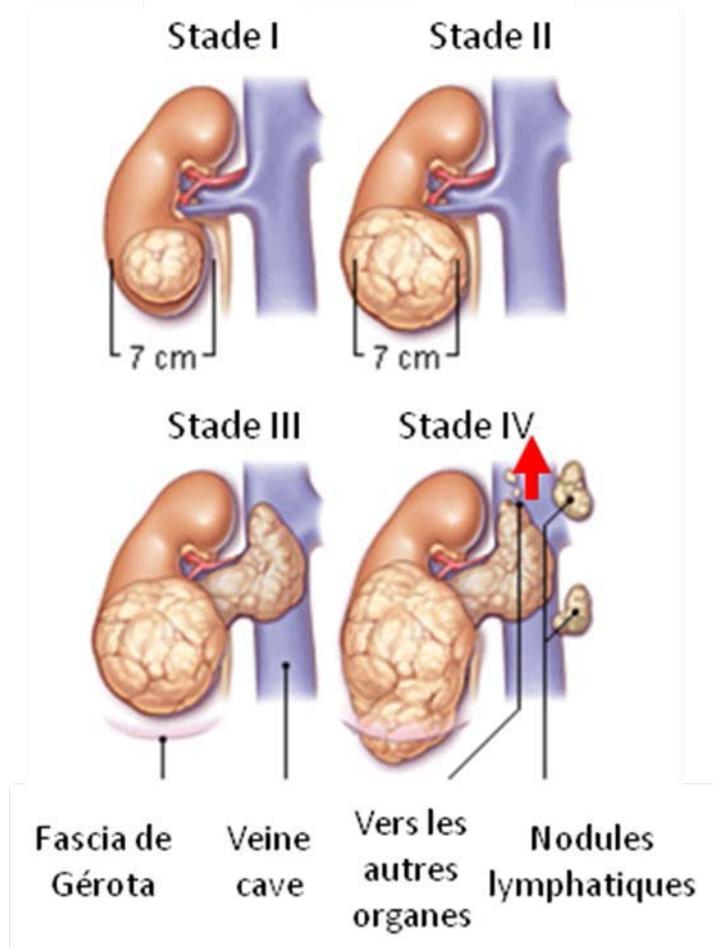


Figure 21 : Stades des carcinomes rénaux. (D'après *Kidney Science Program, Oregon Health & Science University*).

Le carcinome rénal à cellules claires a une meilleure propension pour l'invasion vasculaire plutôt que l'invasion lymphatique (Bonsib, 2004) avec des cellules malignes trouvées dans les petites veines intra-rénales (Cho et al., 2009). L'invasion dans le sinus rénal implique généralement une extension de la veine rénale.

Des RCC dans le même stade peuvent présenter un comportement biologique distinct. Par conséquent, d'autres indicateurs qui pourraient aider à l'amélioration du diagnostic du RCC sont nécessaires.

3.5) Bases moléculaires du carcinome rénal

Le RCC est caractérisé dans 61% des cas par l'inactivation du gène suppresseur de tumeur **von Hippel Lindau (VHL)** situé sur le chromosome 3p25 (van Houwelingen et al.,

2005). VHL encode pour la protéine VHL qui fait partie du complexe **Ubiquitine ligase E3**. Ce complexe cible le facteur de transcription **HIF** pour permettre sa dégradation via le protéasome. Si VHL est inactivé, une protéine défectueuse VHL est produite, HIF n'est alors pas ubiquitinylé puis dégradé. HIF actif est transloqué dans le noyau et mène à la transcription de plusieurs gènes dont le VEGF, le facteur de croissance plaquettaire (PDGF), le facteur de croissance transformant (TGF), lequel a un rôle central dans l'angiogenèse et la progression tumorales. Le VEGF et le PDGF sont sécrétés et interagissent avec leurs récepteurs situés sur la surface des CE ou des cellules tumorales (*figure 22*).

La fixation autocrine de VEGF et PDGF sur leurs récepteurs respectifs entraîne leur dimérisation, puis la phosphorylation de leur domaine tyrosine kinase ce qui active la PI3K, laquelle permet la génération du phosphatidylinositol-triphosphate (PIP3). Le PIP3 recrute la kinase cytoplasmique AKT laquelle active mTor. Cette protéine a deux complexes distincts : TORC1 qui régule positivement la synthèse protéique et le cycle cellulaire et TORC2 qui régule la polarité cellulaire et la croissance dans l'espace en remodelant le cytosquelette d'actine. La signalisation mTor est donc aussi ciblée par des composés analogues de la rapamycine (inhibiteur de mTor) tels que le Temsirolimus qui diminue les niveaux de HIF-1 α et de VEGF *in vitro*. Les patients atteints de RCC métastatique sont traités avec de l'Everolimus, un autre analogue de la rapamycine (*figure 22*).

Le fait que de nombreux gènes soient surexprimés dans le RCC est crucial dans la prise en charge des patients, la thérapie étant généralement dirigée vers un nombre limité de produits de VHL.

Des petites molécules inhibitrices du récepteur au VEGF (VEGFR), du récepteur au PDGF (PDGFR) et des récepteurs liés incluant le sunitinib et le sorafenib sont supposées exercer un effet thérapeutique prépondérant dans le RCC par antagonisme du VEGFR menant à une diminution de l'angiogenèse tumorale. Le sunitinib est connu pour cibler le VEGFR-1, le VEGFR-2, le VEGFR-3, le PDGFR- α et le PDGFR- β et le facteur de cellules souches (Chow et Eckhardt, 2007; Faivre et al., 2007). Il réduit la densité en microvaisseaux de la tumeur, inhibe la néovascularisation et prévient les métastases. Pour cela, il induit l'apoptose et l'arrêt de la croissance des cellules tumorales du RCC (Xin et al., 2009).

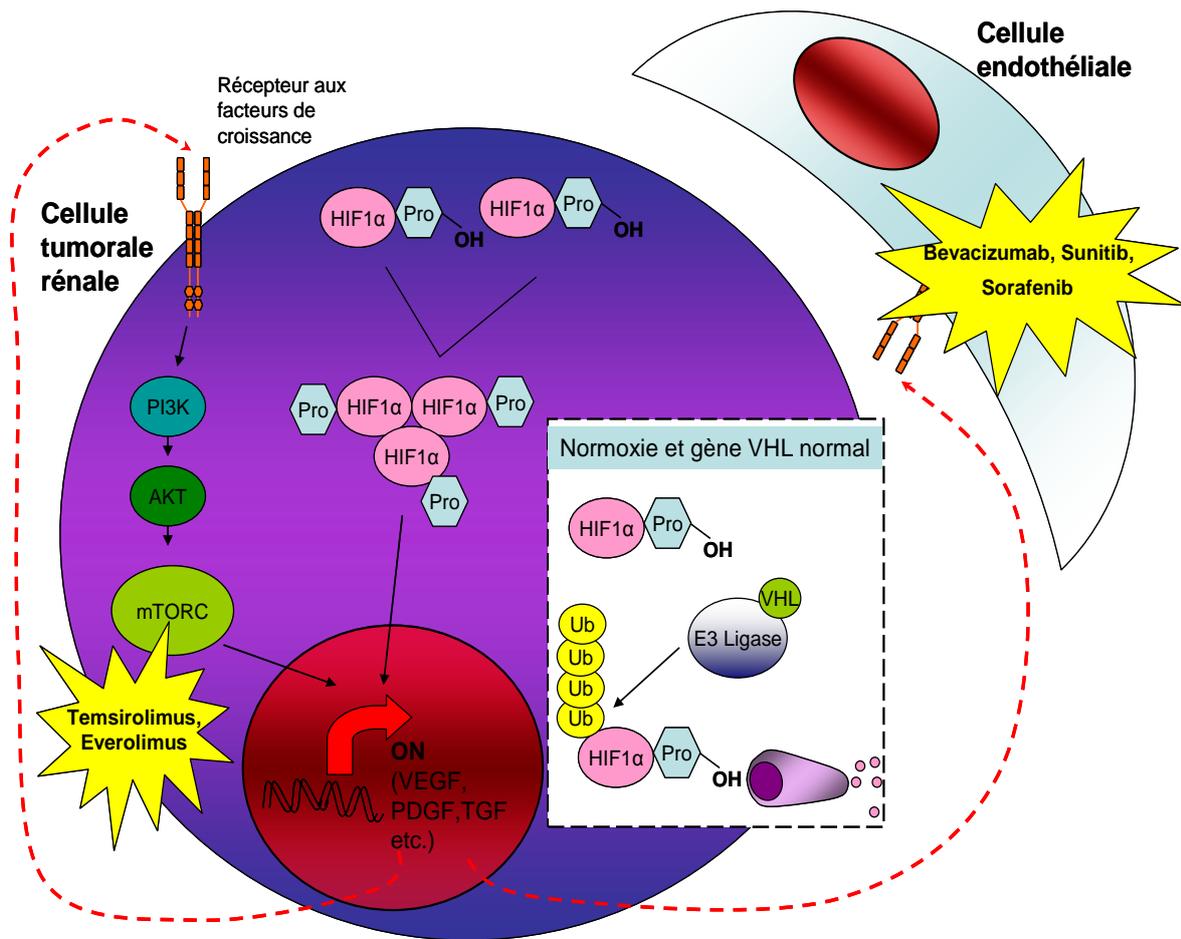


Figure 22: Voies de signalisation et cibles des agents thérapeutiques dans le RCC. (Adapté d'après Rini et al., 2009).

Dans tous les cas, l'inhibition de l'angiogénèse induite par le VEGF ou le PDGF peut déclencher des réponses pro-survie qui peuvent être importantes pour la compréhension de la résistance aux traitements. Les modèles animaux pour l'étude du carcinome à cellules rénales sont particulièrement utiles pour la mise au point de nouveaux traitements contre le cancer du rein. Le modèle Renca est couramment utilisé pour l'étude du carcinome rénal car il présente des similarités avec les carcinomes humains.

Les cellules Renca sont dérivées d'une tumeur qui a poussé spontanément dans les souris BalB/c comme un **adénocarcinome rénal cortical**. Ce modèle présente de multiples intérêts. Par exemple, c'est un modèle syngénique et l'utilisation de souris non-immunodéficientes permet de conserver les réponses immunitaires. Ce modèle est approprié à l'étude de l'angiogénèse tumorale car il présente un haut degré de vascularisation et développe spontanément des métastases dans les ganglions lymphatiques abdominaux, les

poumons, le foie et la rate. De plus, le blocage de la signalisation du VEGF, inhibe l'angiogenèse et affecte l'architecture micro-vasculaire dans ce modèle (Dreys et al., 2004; Dreys et al., 2002).

De part son caractère hypervasculaire et l'implication d'une voie métabolique incluant le VEGF (pVHL-HIF-VEGF) dans près de 70% des cas de tumeurs sporadiques, le carcinome rénal à cellules claires est un type tumoral particulièrement adapté à l'étude des facteurs impliqués dans l'angiogenèse.

4) Mécanismes de résistance aux thérapies angiogéniques

L'organisation des vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur est souvent chaotique. Ces vaisseaux diffèrent des normaux par leur hétérogénéité, leur perméabilité et leur maturation. Ce profil limite la pénétration des drogues utilisées en chimiothérapie et contribue à une forme de résistance au traitement thérapeutique.

Dans le glioblastome et le RCC, l'importance des phénomènes angiogéniques dans le développement des tumeurs, ainsi que l'absence de traitement efficace, incitent au développement de stratégies anti-angiogéniques.

Les thérapies anti-angiogéniques ne sont pas toujours efficaces car la signalisation permettant l'induction de l'angiogenèse est complexe. Différents mécanismes soulignent la résistance à l'utilisation d'anti-angiogéniques chez les patients atteints d'un cancer. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et peuvent se produire simultanément dans une seule tumeur.

La formation de métastases a été observée suite à l'inhibition de la signalisation du VEGF par des inhibiteurs ou par la délétion du gène *VegfA* dans le modèle de souris RIP1-Tag2 qui développe des carcinomes pancréatiques (Pàez-Ribes et al., 2009). Des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de xéno greffe de cancer du sein chez la souris, dans lequel le blocage de la signalisation du VEGFR-2 par le sunitinib, entraîne la formation de métastases, ce qui réduit la survie des souris traitées par rapport aux souris témoins (Ebos et al., 2009). Ces observations ont été aussi faites en clinique comme dans le cas d'un patient atteint d'un glioblastome qui a métastasé suite au traitement à l'Avastin (de Groot et al., 2010). Ce comportement invasif des tumeurs est la conséquence de l'hypoxie (induite par la réduction

vasculaire) ce qui régule positivement la production d'autres facteurs pro-angiogéniques ou augmente l'invasivité tumorale. Ainsi, quand la voie VEGF-A – VEGFR-2 est bloquée par l'Avastin, d'autres voies sont activées telles que celle du FGF. Il est aussi connu que des cellules tumorales qui ont acquis d'autres mutations, peuvent aussi tolérer l'hypoxie (*figure 23a*). Quand l'angiogenèse est bloquée, la tumeur peut avoir recours à d'autres modes de vascularisation incluant l'intussusception, le mimétisme vasculaire, la différenciation de cellules souches cancéreuses en CE, la vasculogenèse et la cooption (*figure 23b*). L'inhibition de l'angiogenèse empêche le détachement des péricytes, les vaisseaux sont plus maturés et alors moins sensibles au blocage du VEGF (*figure 23c*).

De plus, le recrutement des cellules souches provenant de la moelle osseuse, les macrophages ou les fibroblastes activés (CAF) peuvent rétablir la vascularisation de la tumeur en produisant des facteurs pro-angiogéniques (*figure 23d*).

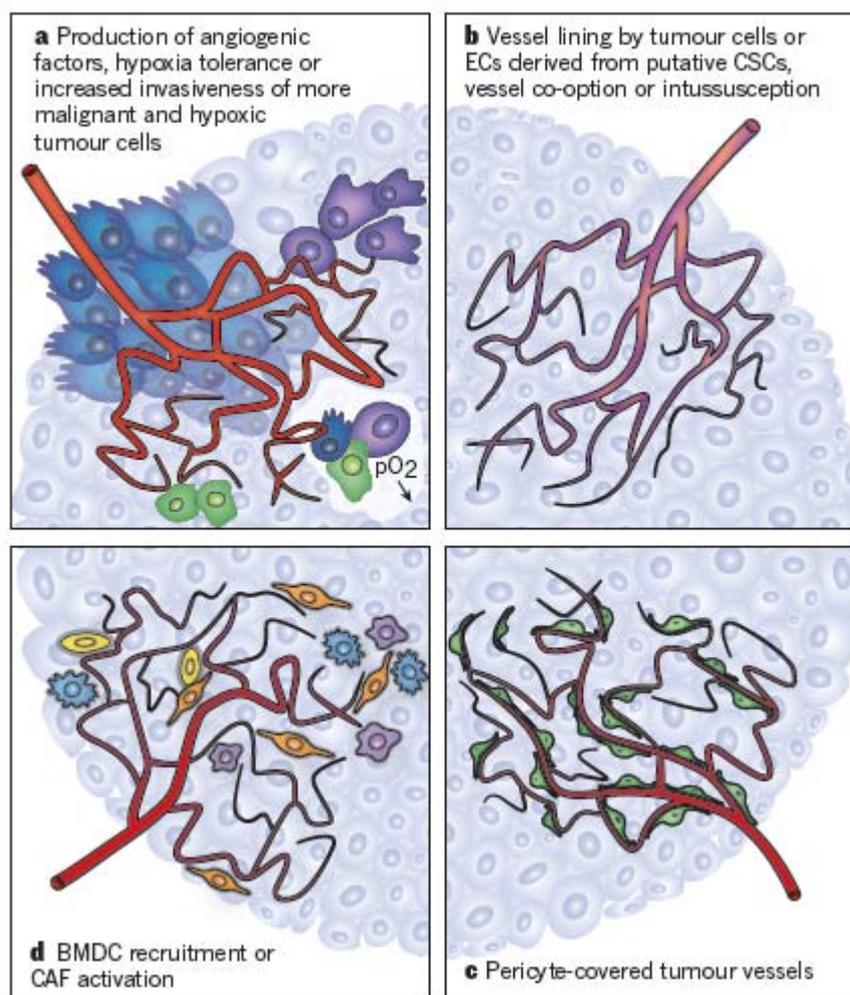


Figure 23: Mécanismes de résistance potentielle aux thérapies visant le VEGF. (D'après Carmeliet et Jain 2011).

III. Les kinésines

L'étude des kinésines se justifie ici par des expériences menées au laboratoire qui montrent l'augmentation des transcrits de cinq kinésines dans des CAM de poulet traitées au VEGF (*cf projet de recherche et annexe 1*).

1) Moteurs moléculaires

Ces protéines sont composées d'un domaine moteur contenant une fonction ATPasique et de domaines responsables de la dimérisation, de la régulation et de l'interaction avec d'autres molécules. L'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine diphosphate (ADP) cause un changement dans la conformation du domaine moteur globulaire, qui est amplifié et traduit en un mouvement. Parmi les moteurs moléculaires, **trois superfamilles** ont été identifiées : les myosines qui se lient aux filaments d'actine et les dynéines / kinésines qui fixent les microtubules (*figure 24*). Les myosines se déplacent le long des filaments d'actine pour permettre la contraction musculaire et assurent aussi le transport d'organelles au niveau de la membrane cytoplasmique (Hammer et Sellers, 2012). Les dynéines se distinguent des kinésines par leur haut poids moléculaire (300kDa comparé à 150kDa pour les kinésines) et leur sens de déplacement le long des microtubules (MT). En effet, les **MTs sont des filaments polarisés** et les **kinésines** se déplacent généralement vers leur extrémité « **plus** » alors que les dynéines se déplacent vers leur extrémité « **moins** ».

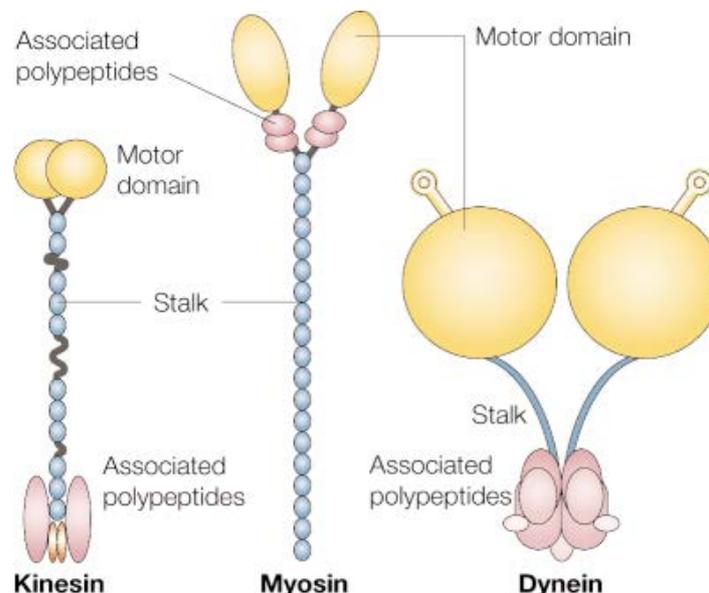


Figure 24: Les moteurs moléculaires classiques. Les trois moteurs consistent en un dimère de chaînes lourdes à qui appartiennent les domaines catalytiques montrés en jaune. Les excroissances au niveau du domaine moteur de la dynéine correspondent au site de liaison avec les MTs, lequel est contenu dans la tête compacte de la kinésine et de la myosine. (*D'après Woehlke et Schliwa 2000*).

2) Structure des kinésines

La superfamille des kinésines (KIFs) est constituée de protéines motrices dont la structure est dimérique. Chez les mammifères, tels que l'humain ou la souris, le nombre total de gènes KIF est de 45 répartis en 14 classes identifiées chez diverses espèces (Vale et al., 1985). Chaque monomère est constitué d'une chaîne légère de 60kDa et d'une chaîne lourde de 124 kDa. La détermination de la structure de ces protéines par diffraction des rayons X et microscopie électronique a révélé une queue, constituée des chaînes légères entourées, ainsi que deux têtes, constituées des chaînes lourdes (Yang et al., 1989).

Le domaine moteur : la tête

Les kinésines sont réparties en 3 groupes majeurs dépendant de la position du domaine moteur sur la molécule : domaine moteur de KIF en N-terminal (N-KIFs), au milieu (M-KIFs) et en C-terminal (C-KIFs). Celui-ci est assez conservé parmi tous les organismes eucaryotes et les kinésines présentes chez les plantes ont aussi un rôle dans la mitose et dans le transport unidirectionnel de nombreux cargos (organelles, protéines complexes et d'ARNm). En particulier, Eg5 et la kinésine-14 observées chez les plantes semblent être similaires à celles présentes chez les animaux et les champignons (Li et al., 2012).

Les domaines moteurs des kinésines contiennent chacun un site de liaison aux MTs et un site de liaison aux nucléotides ainsi qu'une **fonction ATPasique**. Pour cela elles utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP (adénosine triphosphate), grâce au site de phosphorylation situé sur une tête (*figure 25*) (Vale et al., 1985). Une fois les kinésines liées aux MT, la liaison de l'ATP déclenche une modification de conformation du cou de la kinésine, auquel le cargo est lié (Cohn, 1987).

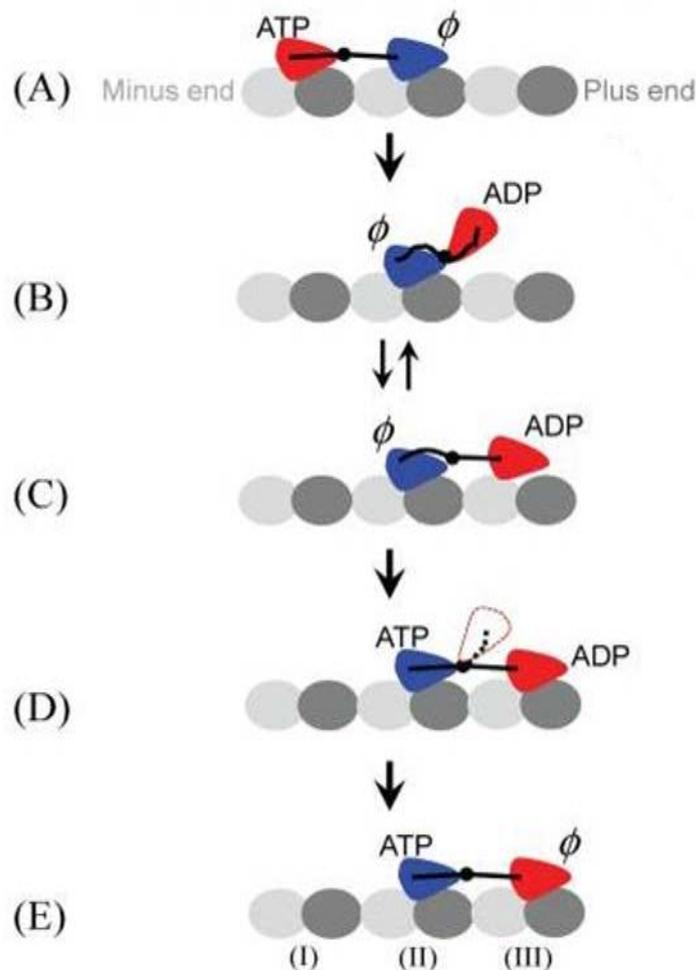


Figure 25: Cycle efficace de déplacement d'une kinésine le long d'un microtubule. Le cycle débute avec les deux têtes en contact avec le MT avec une tête fixant l'ATP. La tension subie par les deux cous, induite par une forte liaison entre les têtes et le MT accélère l'hydrolyse de l'ATP (en ADP+Pi) et la libération du phosphate (Pi) dans la tête rouge mais réduit la liaison à l'ATP dans la tête bleu (A). Une fois le Pi libéré, la tête qui fixe l'ADP perd son affinité pour le site du MTs (I) et bouge en position d'équilibre vers la deuxième tête. Ceci est dû à l'affinité entre les deux têtes (B). La tête rouge se dirige vers le site le plus proche (III). Parce que le cou de la tête bleu ne peut pas être amarré, la longueur du cou de la tête rouge est trop courte pour permettre à celle-ci de s'approprier le site de liaison (III). Or, la libération de l'ADP de la tête est inhibée sans l'activation du MT. La tête rouge retourne à la position d'équilibre due à la faible interaction avec le site III (ce qui est indiqué par les flèches allant de C à B) (C). Après la liaison de l'ATP à la tête, le cou est amarré permettant à la tête rouge de lier de manière appropriée le MT (D). Le MT est alors activé et permet la libération de l'ADP. La protéine dimérique revient à son état initial en ayant fait un pas. (D'après Xie, 2010 pour revue).

La queue

Au niveau des régions motrices il existe une grande homologie de structure entre les différentes kinésines. Par contre, en ce qui concerne les régions de la queue, elles sont très différentes ce qui confère une **certaine spécificité aux kinésines pour l'élément qui doit être déplacé**. Ces convergences et divergences au niveau des segments constituant la protéine pourraient s'expliquer par leur fonction. En effet, les queues doivent interagir avec divers

organites tels que les vésicules, les organelles, les chromosomes et les protéines complexes. Elles permettent ainsi l'assemblage du fuseau bipolaire, l'alignement et la ségrégation des chromosomes et jouent un rôle dans le transport axonal (Huszar et al., 2009). La liaison cargo-kinésine est régulée par divers mécanismes (*figure 26*).

La phosphorylation des kinésines peut contrôler l'association ou la dissociation avec le cargo. Dans le cas de KIF17, la phosphorylation de sa sérine en position 1029 par la calmoduline kinase II empêche sa liaison avec l'adaptateur LIN-10, menant à une dissociation de la vésicule contenant NRB2 (*figure 26a*).

Des membres de la famille des petites GTPases Rab contrôlent la localisation des organelles. Celles-ci sont régulées par les protéines activant les GTPases (GAP) et les facteurs d'échange des guanines (GEF). Quand GEF est activée, Rab est sous sa forme liée au GTP et peut lier les kinésines, alors que quand GAP est activée, Rab est sous sa forme liée au GDP et ne peut pas lier les effecteurs de Rab. Par exemple Rab3 est une protéine vésiculaire, qui dans sa forme Rab3-GTP, permet de lier la vésicule aux kinésines KIF1A ou KIF1B. Sa forme Rab3-GTP est maintenue pendant tout le transport axonal grâce au complexe DENN-MADD qui correspondrait à une GEF. Puis l'activation de GAP responsable de la forme Rab3-GDP entraîne la dissociation de la vésicule (*figure 26b*). D'autres kinésines interagissent avec les Rab, comme KIF20A dont la localisation au niveau de l'appareil de Golgi est dépendante de sa liaison à Rab6-GTP.

Le transport de mitochondries dans les axones est régulé par le calcium (Ca^{2+}). La kinésine KIF5 est liée aux mitochondries via les adaptateurs Miro et Milton. Miro contient des motifs EF, lesquels sont capables de détecter les niveaux de Ca^{2+} . En réponse à un fort influx de Ca^{2+} , ces motifs lient le domaine moteur de KIF5, ce qui inhibe son activité (*figure 26c*).

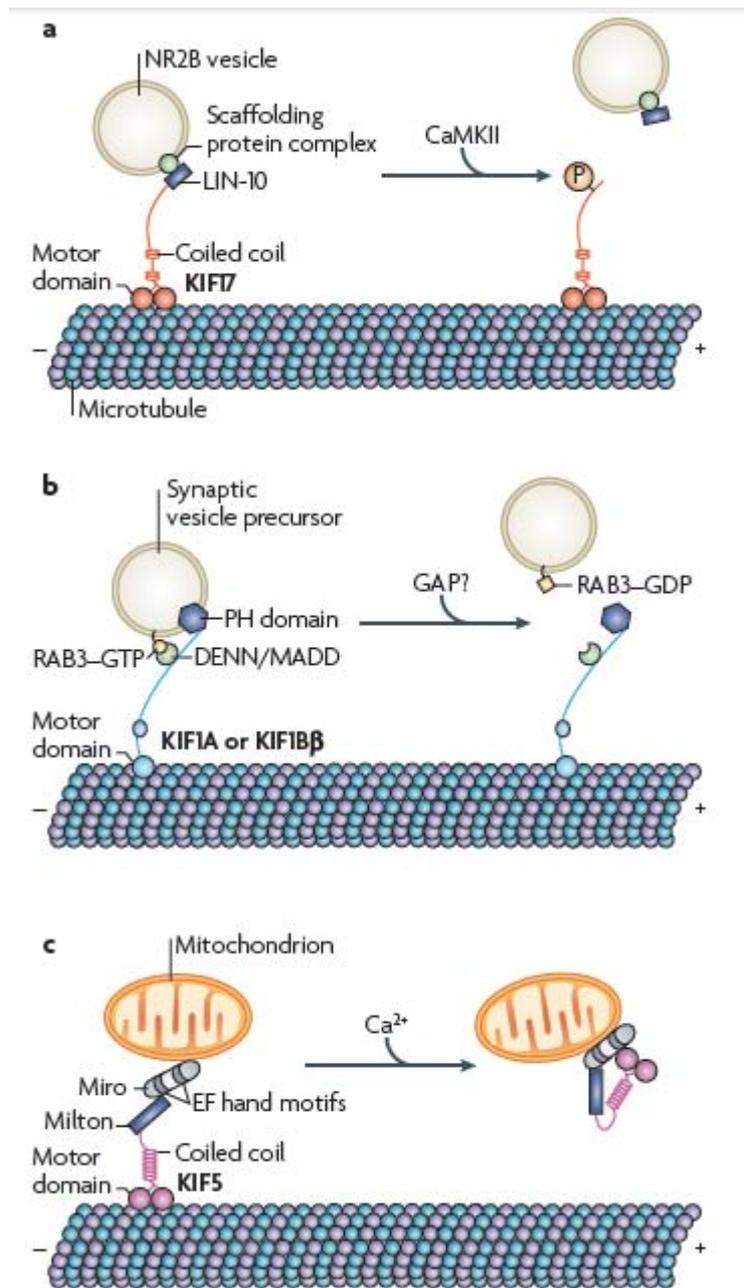


Figure 26: Régulation de la liaison kinésine-cargo par trois mécanismes différents : La phosphorylation de la kinésine (a), les GTPases Rab (b) et le Ca²⁺ (c). (D'après Hirokawa et al., 2009).

3) Fonctions des kinésines

3.1) les transports intracellulaires

Les transports intracellulaires sont essentiels pour la morphogenèse, le fonctionnement et la survie des cellules, non seulement dans les cellules polarisées comme les neurones et les cellules épithéliales, mais aussi dans toutes les autres cellules. Les kinésines assurent les transports entre l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique (RE) et la membrane plasmique ainsi que les transports dans les axones, les dendrites et les cils.

3.1.1) Le transport dans les neurones

Les kinésines ont été identifiées dans l'axone géant du calmar (Vale et al., 1985). Dans les axones, l'extrémité « plus » des MT est dirigée vers l'axone terminale, alors que l'extrémité « moins » est au niveau du corps cellulaire. La plupart des kinésines assurent le transport de protéine synaptique, de mitochondrie et de vésicules, du corps cellulaire vers l'axone terminale. Par exemple, la KIF5 transporte des précurseurs des vésicules synaptiques qui contiennent la synaptogamine et la synaptobrevine, ainsi que des organelles qui contiennent des protéines membranaires présynaptiques telles que la syntaxine et SNAP25 (*figure 27a*). Ces protéines qui se lient à KIF5, permettent la fusion des vésicules avec les membranes plasmiques (Diefenbach et al., 2002). Si ce processus est altéré par une mutation du domaine moteur de KIF5, cela provoque une neuropathie familiale, la paraplégie spastique héréditaire (Reid et al., 2002).

Dans les dendrites, le transport des récepteurs aux neurotransmetteurs glutamatergiques (NMDAR et AMPAR) et les ARNm, assuré par KIF5 et KIF17 est essentiel à la transmission synaptique et à la plasticité du système nerveux (Chu et al., 2006; Setou et al., 2002).

3.1.2) Le transport « conventionnel ».

Au niveau du corps cellulaire des neurones et dans les cellules non neuronales, diverses kinésines sont impliquées dans le transport du Golgi au RE et du réseau trans-golgien à la membrane plasmique. Elles assurent aussi le transport d'endosomes, de liposomes et de cargos (*figure 27b*). Par exemple KIF3 transporte des vésicules contenant de la N-Cadhérine et de la β -Caténine vers la membrane plasmique. Ceci contribuerait à l'adhésion cellule-cellule et à la régulation négative de la voie canonique Wnt, laquelle permet la prolifération cellulaire. Au niveau de l'organisme, l'inactivation conditionnelle d'une sous unité de KIF3 provoque la formation de tumeurs du cerveau (Teng et al. 2005).

Dans les cils et les flagelles, le transport intra-flagellaire est assuré par les KIF17 et KIF3 (*figure 27c*).

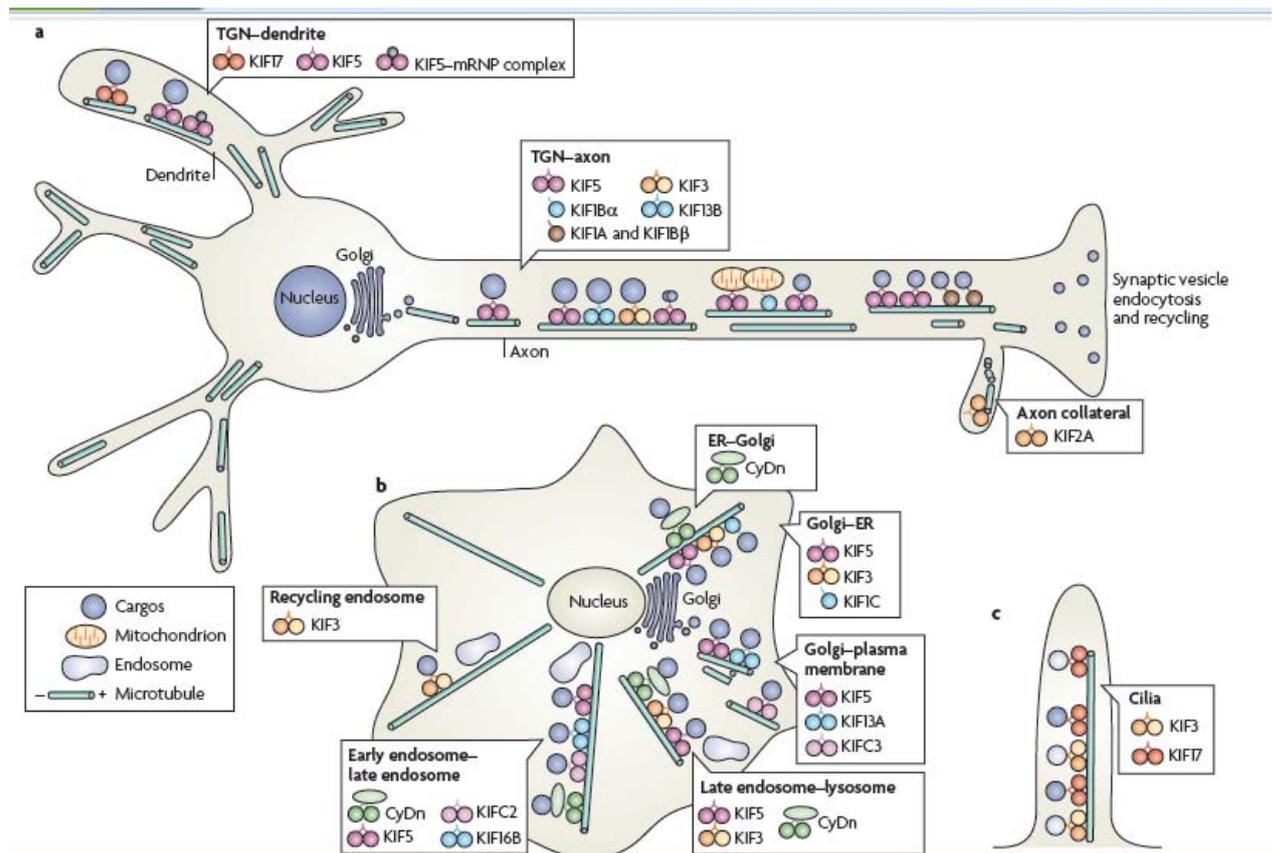


Figure 27 : Le transport intracellulaire par les kinésines dans les neurones, les cellules non neuronales et les cils. (D'après Hirokawa et al., 2009).

La variété des kinésines impliquées dans les transports intracellulaires ne se limite pas à celles décrites précédemment. D'autres kinésines telle que KIF4 transporte de manière antérograde, des organelles impliquées dans la morphogenèse des neurones (Sekine et al., 1994). En plus d'assurer le transport intracellulaire, des moteurs dirigés dans des sens contraires permettent le positionnement correct d'organelles dans la cellule. Par exemple il a été montré que KIF20A permet le positionnement de l'appareil de Golgi (Echard et al., 1998).

2.2) La régulation de la mitose

La mitose est une étape clé de la reproduction asexuée et de la prolifération cellulaire pour les mammifères.

Décrit pour la première fois en 1844 par Carl Nageli, ce phénomène avait tout d'abord été identifié comme une anomalie. En effet, il avait été observé dans des cellules fixées et colorées, donc mortes.

En 1879, Walter Flemming démontre que la mitose est un processus naturel. Son observation des épais chromosomes dans les cellules d'embryon de salamandre lui permet aussi de

décomposer ce phénomène en étapes qui sont l'interphase, la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

Bien que la tubuline soit la protéine la plus abondante du fuseau mitotique, beaucoup de protéines sont impliquées dans sa régulation et sa fonction, parmi elles, les kinésines mitotiques (Zhu et al., 2005). L'analyse de domaines moteurs de kinésines et dynéines a mis en évidence l'intervention de 12 kinésines au cours de la mitose et de la cytokinèse (*figure 28*) (Fontijn et al., 2001; Hill et al., 2000). Ces kinésines contribuent à la mitose en s'associant à la plupart des structures du fuseau mitotique tels que les chromosomes, les kinétochores ou en encore les microtubules astraux et kinétochoriens (*figure 34*).

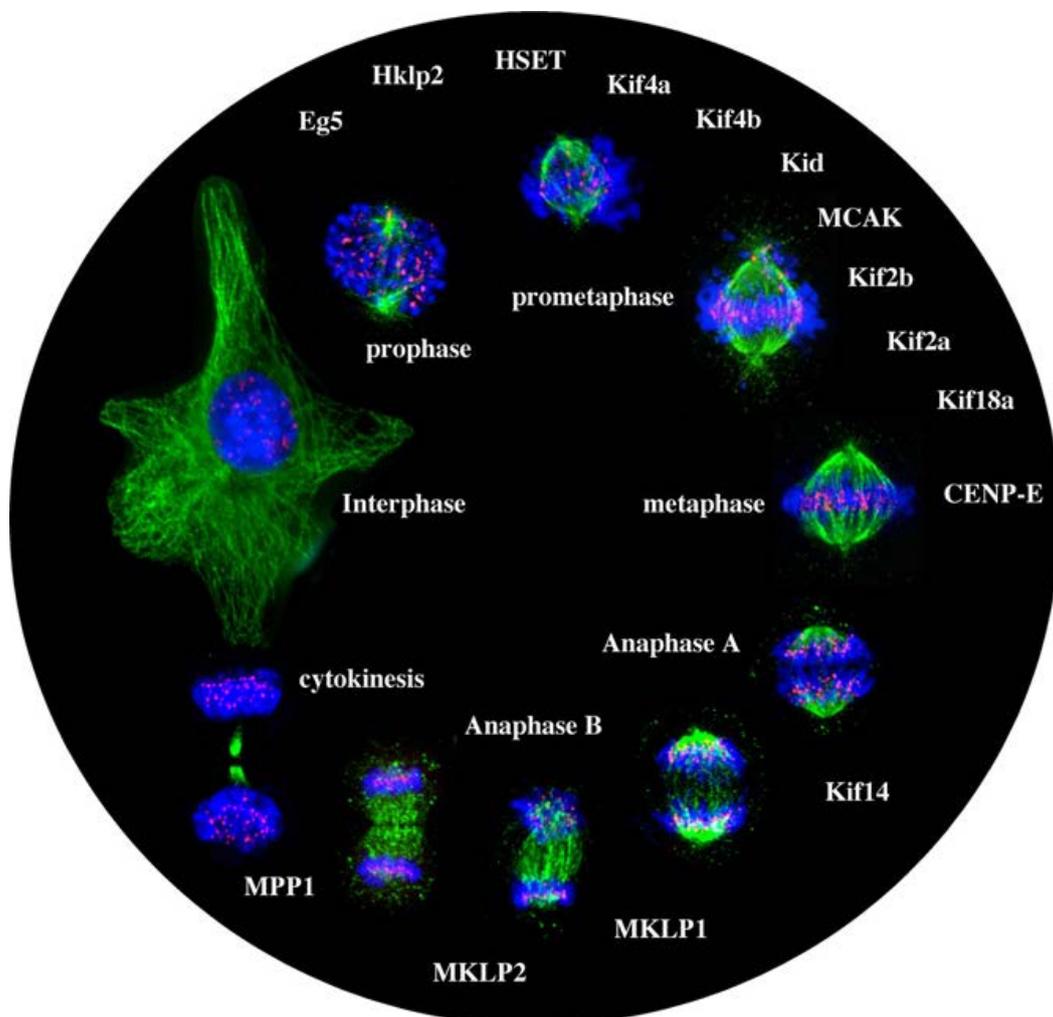


Figure 28: Les kinésines impliquées dans les diverses étapes de la mitose. Les MTs sont en vert, les chromosomes sont marqués en bleu par le DAPI et les centromères sont en rouge. (*D'après Good et al., 2011*).

Prophase

Elle correspond à la première phase de la division cellulaire. Pendant cette phase, les centrosomes (ou centres organisateurs des MT (MTOC)) qui ont été dupliqués pendant la phase S se séparent. Ils deviennent alors une partie d'un complexe centriolaire qui forme le foyer d'un arrangement radial de microtubules: **l'aster**. Les deux asters qui étaient côte à côte, s'éloignent en prophase suite à l'interaction des microtubules polaires. De cette façon, une structure essentielle à la ségrégation du matériel génétique entre les deux cellules filles est formée : le **fuseau mitotique** bipolaire.

La séparation des centrosomes est donc un processus pivot dans la stabilité des chromosomes. Ainsi, des anomalies dans la séparation des centrosomes sont associées à des fuseaux mono- ou multipolaires qui conduisent à des instabilités dans le génome (Ganem et al., 2009) et au cancer (Basto et al., 2008).

La **séparation des centrosomes** qui est initiée par la perte de cohésion entre les deux paires de centrioles, est fortement **dépendante de la kinésine Eg5** (Whitehead et Rattner, 1998). La phosphorylation de cette kinésine sur la sérine en position 1033 par la kinase Nek6, permet son recrutement aux alentours des centrosomes. Une mutation de cette sérine en acide aminé non phosphorylable tel que l'alanine empêche la localisation centrosomale d'Eg5 mais celle-ci est toujours capable de lier les MT (Rapley et al., 2008).

Une autre kinésine, **Hklp2/KIF15** possède des **similarités fonctionnelles avec la kinésine Eg5**. Tout comme Eg5, cette kinésine peut conduire à la séparation des centrosomes pendant l'assemblage du fuseau bipolaire (Vanneste et al., 2009). Il a été aussi démontré que KIF15 coopère avec Eg5 pour permettre l'assemblage du fuseau bipolaire quand celle-ci est partiellement inhibée via la modulation de la dynamique des microtubules (Florian et Mayer, 2011) (Tanenbaum et al., 2009). Si l'activité d'Eg5 est inhibée, KIF15 peut remplacer les fonctions principales d'Eg5 dans l'assemblage du fuseau mais elle n'est pas essentielle à sa formation (Walczak et al., 1998; Wittmann et al., 2000).

Contrairement à Eg5 ou KIF15, la kinésine **HSET** est une kinésine qui migre vers l'extrémité « moins » des MT. Cette kinésine qui n'est pas essentielle à la formation d'un

fuseau bipolaire dans les cellules « normales », est essentielle à la survie des cellules cancéreuses. Elle a un rôle antagoniste à Eg5 et permet le regroupement des centrosomes. Sa déplétion induit des fuseaux multipolaires et donc la mort des cellules filles issues de cellules possédant des centrosomes surnuméraires sans affecter les cellules saines qui possèdent deux centrosomes (Kwon et al., 2008).

Prométaphase

La prométaphase débute par la désintégration de l'enveloppe nucléaire dont les vestiges se différencient en vésicules et en réticulum endoplasmique. A la fin de la prophase les microtubules en alternant croissance et raccourcissement à leur bout distal « plus », vont au hasard à l'encontre des chromosomes. Certains microtubules s'accrochent à des complexes protéiques spécialisés qui se trouvent au niveau des centromères : les kinétochores. Ils seront alors appelés **microtubules kinétochoriens (MTk)**. Les interactions entre kinétochores et MTs mènent souvent à des liaisons incorrectes, ce qui nécessite un contrôle impliquant la kinésine associée aux centromères mitotiques (MCAK) et la kinésine KIF2B (*figure 29*).

D'une part, **KIF2B** est localisée au niveau des kinétochores exclusivement pendant la prométaphase (Manning et al., 2007) et déstabilise les MTK pour permettre la correction de chacun des chromosomes mono-orientés et des kinétochores mérotéliques (kinétochore attaché aux deux pôles).

D'autre part, **MCAK** corrige les erreurs restantes au niveau de l'attachement des kinétochores via son activité dépolymérisante des MTs (Tanenbaum et al., 2011). Celle-ci contribue donc au maintien du comportement dynamique des MTK pendant la métaphase (Andrews et al., 2004). Plus récemment, il a été montré que cette kinésine augmente le recyclage des kinétochores (Wordeman et al., 2007).

Les « corrections » de ces kinésines permettent ainsi le maintien de la stabilité du génome (Bakhoun et al., 2009).

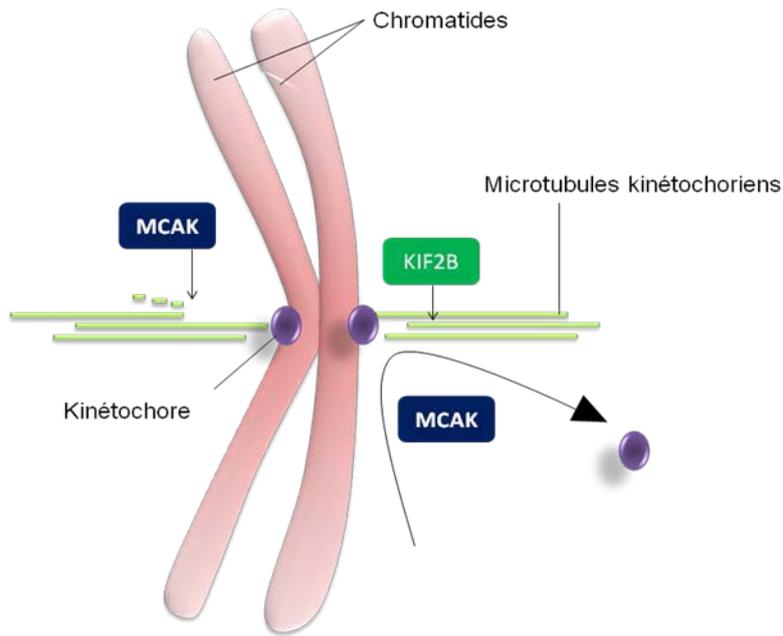


Figure 29 : Modèle pour les corrections de liaison des microtubules aux kinétochores via MCAK et KIF2B.

Certaines kinésines, telle que la chromokinésine **KIF4A**, se lient directement aux bras des chromosomes. KIF4A est requise pour le maintien d'une morphologie normale des chromosomes en métaphase à travers le complexe de la condensine et sa délétion est associée à une hypercondensation des chromosomes (Mazumdar et al., 2004).

Les autres microtubules sont accrochés seulement aux centrosomes et ne font pas partie du fuseau mitotique. Ils forment l'aster et sont appelés microtubules astraux ou **microtubules polaires**. De part sa configuration homotétramérique, la kinésine mitotique **Eg5** est capable de se lier à deux microtubules astraux antiparallèles et de créer une zone de chevauchement. La réorientation de son cou, moins flexible qu'une kinésine conventionnelle, lui permet alors de faire glisser les microtubules dans des sens opposés (*figure 30*).

Eg5 migre alors vers les extrémités « plus » des MTs antiparallèles et ralentit le moment de la séparation des demi-fuseaux en modulant les interactions MT-MT (*figure 31*).

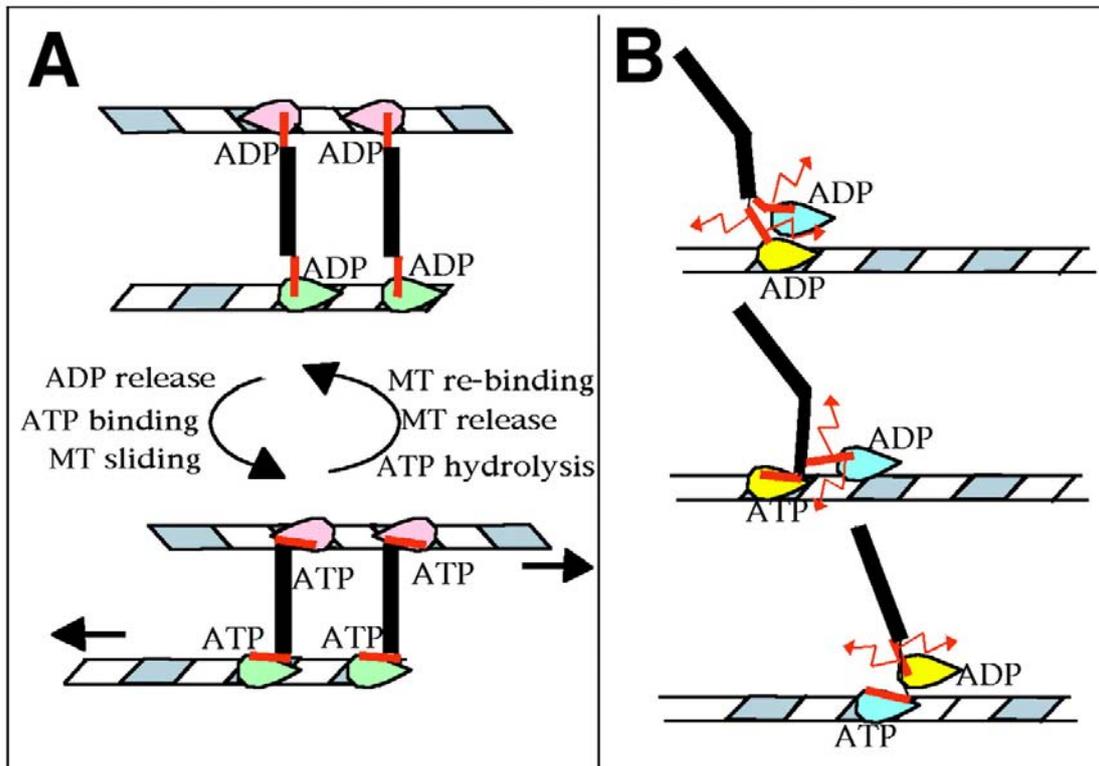


Figure 30: Comparaison de la motricité d'Eg5 avec un moteur moléculaire typique associé aux mouvements du cou des kinésines. Les sites d'interactions potentielles des kinésines avec les microtubules sont en gris. Les moteurs Eg5 avec l'ADP lié ont leur cou perpendiculaire aux microtubules. Lors de l'échange d'ADP pour l'ATP, une série de changements de conformation a lieu telle que la réorientation du cou parallèle au moteur et aux microtubules, ce qui provoque des coulissements des microtubules vers leur extrémité « moins » (A). En contraste, le modèle pour le mouvement des kinésines conventionnelles le long des microtubules requiert que le cou soit flexible quand la kinésine est liée à l'ADP. Cette flexibilité est illustrée par les flèches rouges (B). (D'après Turner et al., 2001).

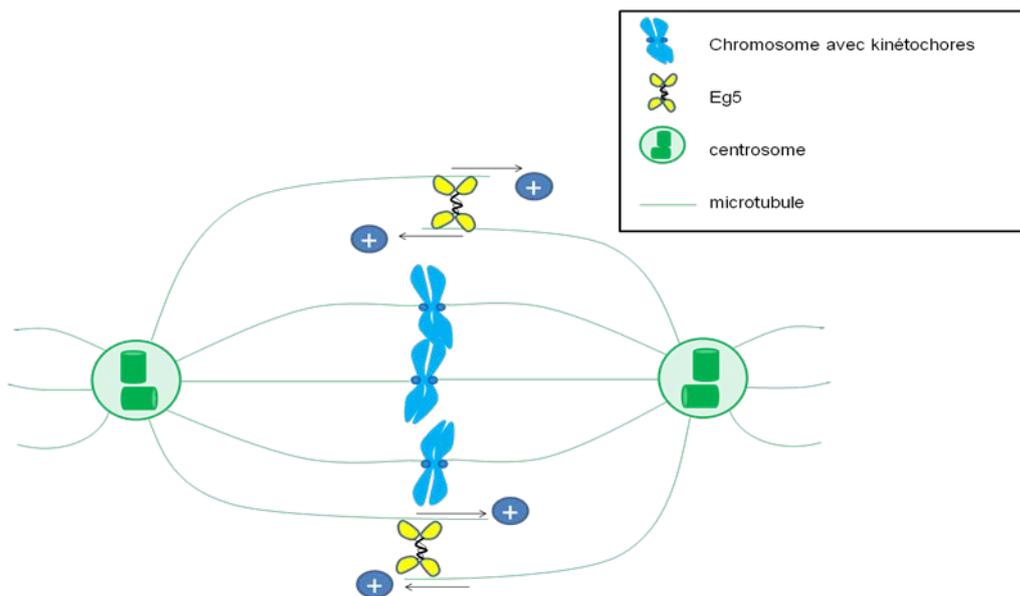


Figure 31: Fonction d'Eg5 au cours de la mitose via les interactions MT-MT. Eg5 migre vers le pôle « plus » des microtubules et permet l'alignement des chromosomes.

Métaphase

Durant cette phase, les chromosomes formés de deux chromatides sœurs migrent des pôles de la cellule vers la plaque équatoriale avec des mouvements oscillatoires. La direction du mouvement des chromosomes est premièrement dirigée par des forces répulsives dues à la dépolymérisation de l'extrémité « plus » des MTs. Ce processus appelé **congression des chromosomes** est dépendant de kinésines incluant KIF18A, KIF18B, KID et MCAK. Cette dernière qui régule aussi la liaison des MTs aux kinétochores a été décrite partie « prométaphase ».

Un modèle proposé pour le contrôle des oscillations des chromosomes est que la microtubule-dépolymérase **KIF18A** s'accumule en fonction de la longueur des MT, ce qui augmente l'expression de cette kinésine au niveau des kinétochores. Une fois le seuil de KIF18A atteint, la dépolymérisation des microtubules au niveau des kinétochores est initiée, ce qui influence le contrôle du positionnement des chromosomes (*figure 32*) (Stumpff et al., 2011). **KIF18B** qui est aussi impliquée dans le transport d'organelles dans les cellules en interphase, est aussi requise dans le positionnement des pôles du fuseau à travers son interaction avec les MTs astraux (Lee et al., 2010).

KID est une chromokinésine qui lie les bras des chromosomes et des MTs du fuseau (Levesque et Compton, 2001).

La kinésine associée au kinétochore **CENP-E** contribue à la congression et l'alignement des chromosomes via la capture des MTs par les kinétochores (Mao et al., 2005).

KIF14 régulent le rassemblement et l'alignement des chromosomes via son interaction avec deux protéines mitotiques Citron kinase et PCR-1 (Gruneberg et al., 2006).

Les tensions subies par chacun des kinétochores d'un chromosome s'équilibrent progressivement et ceux-ci s'alignent dans un plan situé à mi-chemin des deux pôles.

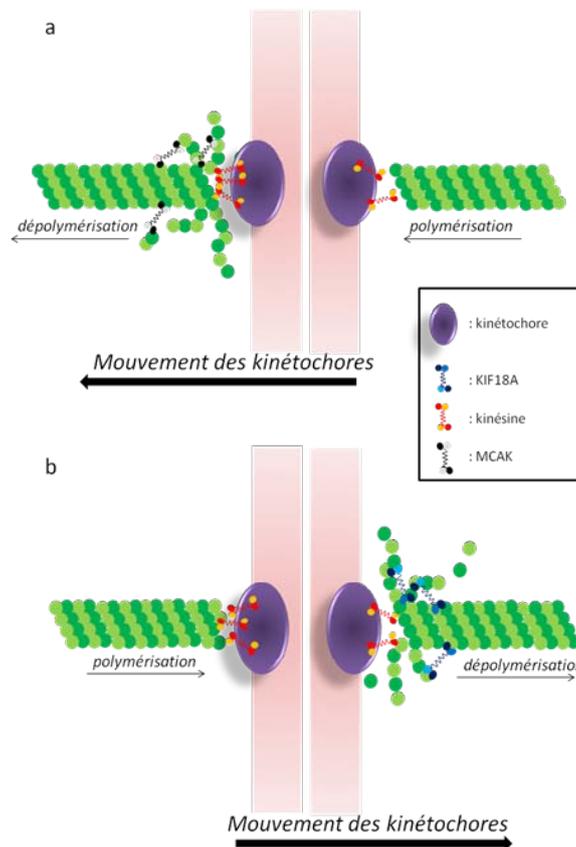


Figure 32: Représentation schématique du mouvement des chromosomes.

Anaphase

L'anaphase est caractérisée par la ségrégation des chromosomes aux pôles de la cellule. Ce phénomène peut être dû à la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens (Anaphase A) ou à l'éloignement des pôles (Anaphase B). L'anaphase A requiert des kinésines dépolymérisantes telles que MCAK dont le rôle dans la ségrégation des chromosomes, est crucial pour le maintien de l'intégrité du génome durant la mitose (Maney et al., 1998). L'anaphase B fait intervenir Eg5, qui se dirige vers l'extrémité « plus » et chevauche des microtubules polaires ce qui repousse les pôles (Gable et al., 2012). Celles-ci ont un rôle essentiel dans la régulation de la dynamique des fuseaux en anaphase et dans la cytokinèse.

Cytodiérèse

Appelée encore **cytokinèse** ou **cytocinèse**, la *cytodiérèse*, correspond au partage du cytoplasme. C'est un phénomène distinct de la mitose mais qui se produit en corrélation avec elle au cours de l'anaphase et de la télophase. Il implique un nombre d'évènements complexes

régulés chacun spatialement et temporellement qui requiert l'intervention de plus de 200 protéines différentes. Parmi elles, des kinésines incluant MKLP-1/KIF23, MKLP-2/KIF20A, la phosphoprotéine mitotique MPP1/KIF20B et KIF14 qui ont un rôle majeur dans la cytokinèse.

La kinésine mitotique **MKLP-2** est essentielle à la cytokinèse en interagissant avec plusieurs de ses acteurs lors de la transition métaphase-anaphase. Par exemple, la Polo kinase 1 (Plk1) est un régulateur mitotique qui permet la formation d'un fuseau normal en métaphase et en cytokinèse. Cette kinase phosphoryle MKLP-2 ce qui permettrait leur relocalisation au niveau du fuseau central en anaphase pour permettre la cytokinèse. Un modèle suggère que la liaison de MKLP-2 et Plk1 permet à la kinésine de réguler d'autres acteurs de la cytokinèse via leur phosphorylation (*figure 33*) (Neef et al., 2003).

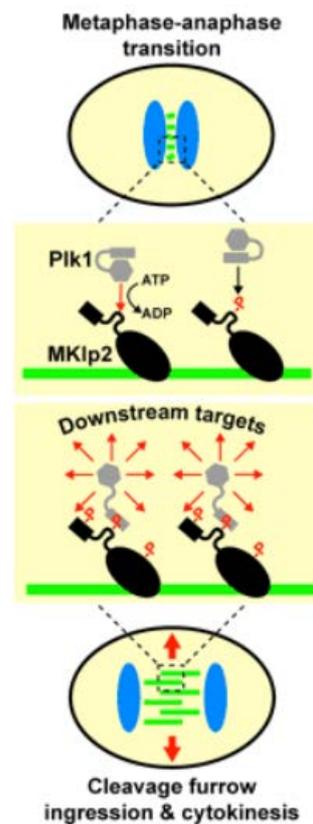


Figure 33: MKLP-2 et Plk forment un dispositif détecteur de microtubules. Dans l'anaphase, comme les chromatides (en bleu) se séparent, MKLP-2 est recrutée au niveau des microtubules (en vert) en formation qui seront à l'origine du fuseau central. Plk1 est capable de s'associer faiblement aux microtubules, n'est pas présente dans toutes les structures des microtubules. Il nécessite une interaction entre Plk1 et d'autres facteurs, pour que cette kinase soit bien localisée. Il semblerait que MKLP-2 soit un tel facteur. Plk1 s'associe avec les microtubules et phosphoryle MKLP-2, lequel se lie avec Plk1 pour maintenir une association stable avec le fuseau central. Ce modèle propose que MKLP-2 est dépendante de la phosphorylation et la liaison avec Plk1 pour contrôler la cytokinèse via la phosphorylation d'autres cibles au fuseau central et dans le sillon de division. (*D'après Neef et al., 2003*).

MKLP-2 est aussi requise pour la formation du CPC (Chromosome Passenger Complex) et sa localisation des centromères à la plaque équatoriale (métaphase-anaphase) (Gruneberg et al., 2004; Schumacher et al., 1998). Le CPC est un acteur clé dans la cytokinèse et est composé d'un complexe de protéines qui sont Aurora B, Survivine, INCENP et Boréaline (Ruchaud et al., 2007). Ces protéines sont impliquées dans le point de contrôle du fuseau mitotique et corrigent les défauts d'attachement des MTs du fuseau aux kinétochores. Son rôle fait de MKLP-2 une cible privilégiée pour des protéines virales telle que E2, protéine du papillomavirus. La liaison de E2 à MKLP-2 assurerait le partitionnement du génome viral au cours de la cytokinèse (Yu et al., 2006).

MKLP-2 possède des séquences relativement homologues avec une autre kinésine MKLP-1 avec laquelle elle interagit pour permettre la cytokinèse. La déplétion des deux kinésines mitotiques provoquent un défaut de la cytokinèse aboutissant à des cellules multinuclées. Il a aussi été montré que l'inhibition de la fonction de MKLP-2 seule par un anticorps, bloque la cytokinèse (Hill et al., 2000)

La kinésine **MKLP-1** forme un complexe avec des protéines de la famille des Rho GTPases CYK-4, et MgcRacGap, (Jantsch-Plunger et al., 2000; Mishima et al., 2002) pour organiser les faisceaux des MTs du fuseau mitotique en réalisant des pontages entre ces MTs.

2.2) Conséquences d'erreurs mitotiques

Pendant la mitose, la cellule subit des changements structuraux pendant lesquels des remaniements chromosomiques peuvent se produire. Le rôle des kinésines est primordial et des dysfonctions de ces protéines peuvent entraîner des anomalies. Par exemple, des études ont montré que l'inhibition de la kinésine Eg5 ou la déplétion de CENP provoque l'aneuploïdie dans des oocytes et des hépatocytes respectivement (Mailhes et al., 2004; Weaver et al., 2003).

Schéma récapitulatif

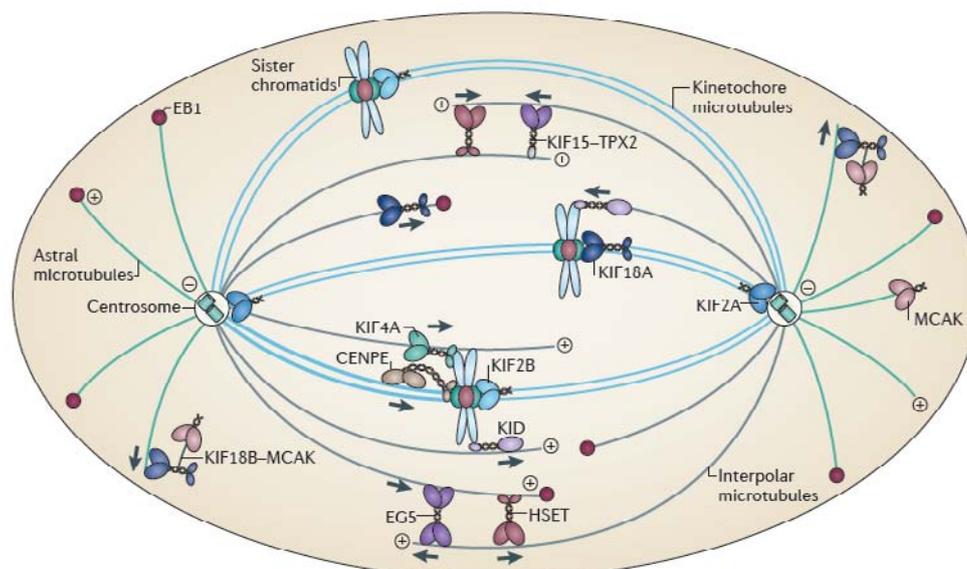


Figure 34: Modèle simplifié des rôles de différentes kinésines au cours de la mitose. Les kinésines interagissent ou sont régulées par plusieurs autres protéines incluant des kinases mitotiques, des protéines associées aux MT (MAP) ou d'autres protéines non mitotiques. Ces interactions ne sont pas décrites dans la figure ci-dessus. D'après (Rath et Kozielski, 2012).

4) Rôle des kinésines dans le cancer

La mitose est très dépendante des microtubules, filaments grâce auxquels sont tractés les chromosomes. Ainsi, les drogues qui interfèrent avec l'instabilité des microtubules diminuent donc la prolifération des cellules et sont couramment utilisées dans les thérapies du cancer pour leur potentiel antiprolifératif. La première génération de ces drogues appelées **poisons du fuseau** comprend les *vinca-alcaloïdes* (vinblastine, vincristine, vindésine, vinorelbine) qui inhibent la polymérisation de la tubuline en microtubules et les taxanes (paclitaxel et docétaxel) qui inhibent la dépolymérisation des microtubules.

L'un d'entre eux, le paclitaxel inhibe la mitose en favorisant la polymérisation des microtubules. Ceux-ci n'étant plus capables de former le fuseau mitotique responsable de la séparation des chromosomes, la mitose est bloquée et les cellules ne peuvent plus proliférer (équivalent à la chimiothérapie) (Wani et al., 1971).

Pourtant le paclitaxel est neurotoxique. En effet, étant donné que les microtubules sont impliqués dans le transport de protéines et de vésicules, ces agents qui inhibent la mitose en

altérant la dynamique des microtubules sont particulièrement néfastes. De plus, le blocage de la mitose par ces agents peut être contré par un phénomène de résistance (mutation de la tubuline, surexpression des pompes entraînant l'efflux des drogues, expression altérée d'un sous type de tubuline). Il était donc nécessaire de développer des agents anti-cancéreux moins nocifs et plus puissants.

L'inhibition des kinésines mitotiques et en particulier la kinésine Eg5, a permis une avancée en matière d'anti-mitotiques dans le traitement du cancer.

4.1) Eg5

La kinésine Eg5 aussi appelée KIF11 ou kinésine des fuseaux (KSP), est associée à la famille Eg qui correspond à des protéines dont les ARNm sont déadénylés et relargués tôt des polysomes après fécondation des œufs de xénopes (Le Guellec et al., 1991).

Elle est constituée de dimères de dimères associés de manière anti-parallèle. Chaque dimère contient une paire de domaine moteur globulaire en position N-terminale reliée par un « neck-linker », un long domaine central en hélices α organisé en « coiled-coil » et une région « tail » en position C-terminale comportant un motif particulier noté « BimC » (*figure 35a*).

La boucle L5 située dans le domaine moteur (tête d'Eg5), est très longue comparée à celle des autres kinésines. Cette boucle affecte la conformation de la poche nucléotidique empêchant ainsi le dimère de la tête de lier simultanément les MT et l'ADP (Waitzman et al., 2011). Ainsi, la boucle L5 est critique pour le mouvement d'Eg5 et correspond au site de liaison de divers inhibiteurs de la kinésine (Harrington et al. 2011).

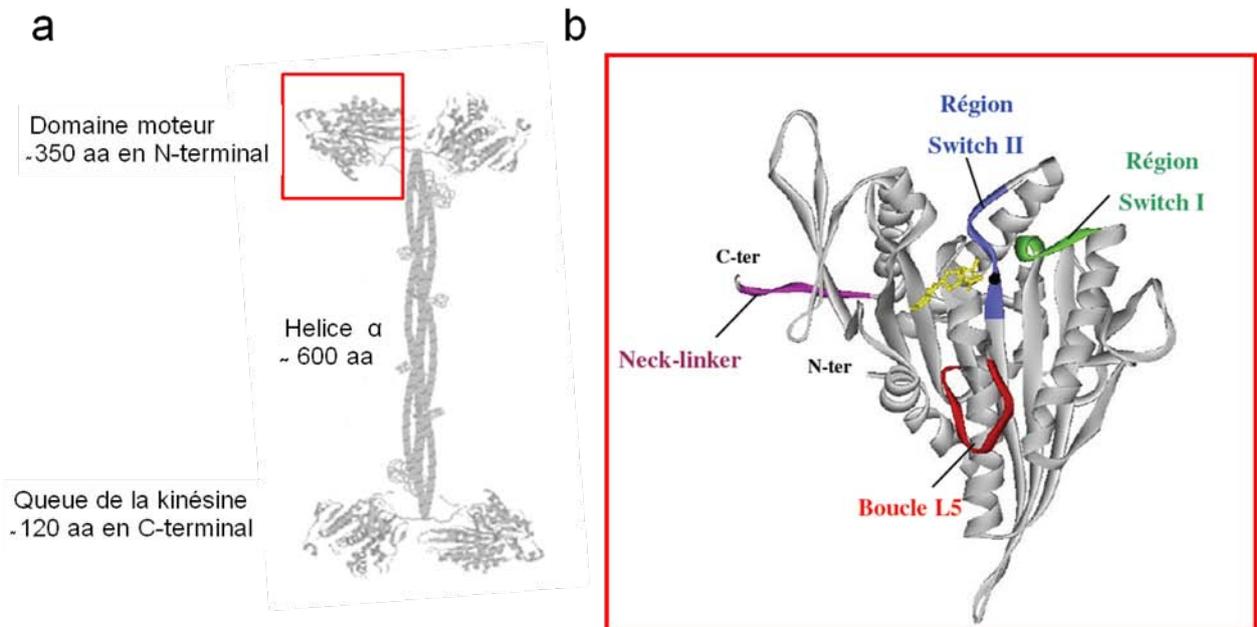


Figure 35 : Structure de la kinésine Eg5 et de son domaine moteur. Structure générale d'Eg5 (a). Structure du domaine moteur d'Eg5 en présence d'ADP (en jaune) et de Mg^{2+} (bille noire). Les deux régions « switch » permettent la fixation de l'ATP au niveau du site catalytique et transmettent les modifications conformationnelles au sein de la protéine. Ces changements structuraux modulent l'affinité du domaine moteur vis-à-vis des microtubules (b). (Extrait de la thèse de Sébastien Brier).

Fonction d'Eg5

Cette protéine motrice est donc nécessaire à la bipolarisation du fuseau, ce qui lui confère l'appellation de protéine des fuseaux KSP (pour Kinesin Spindle Protein), mais aussi à la séparation des centrosomes (Smith et al., 2011) (Bertran et al. 2011), des fonctions qui ont été abordées dans les paragraphes précédents. Ainsi, l'inhibition de KSP par de petites molécules, la microinjection d'anticorps, ou un siARN, inhibe la formation du fuseau mitotique. Il en résulte un arrêt mitotique après lequel la cellule peut être destinée à une sortie anormale de la mitose, la reprise du cycle cellulaire ou l'apoptose (Gaglio et al., 1996; Blangy et al., 1995; Kapoor et al., 2000). Dans les cellules dans lesquelles Eg5 a été inhibée, les chromosomes sont condensés et encerclent les pôles du fuseau attenant, communément appelé **fuseau de mono-astre** avec de l'ADN dans une configuration rosette (Tao et al., 2005) (figure 36).

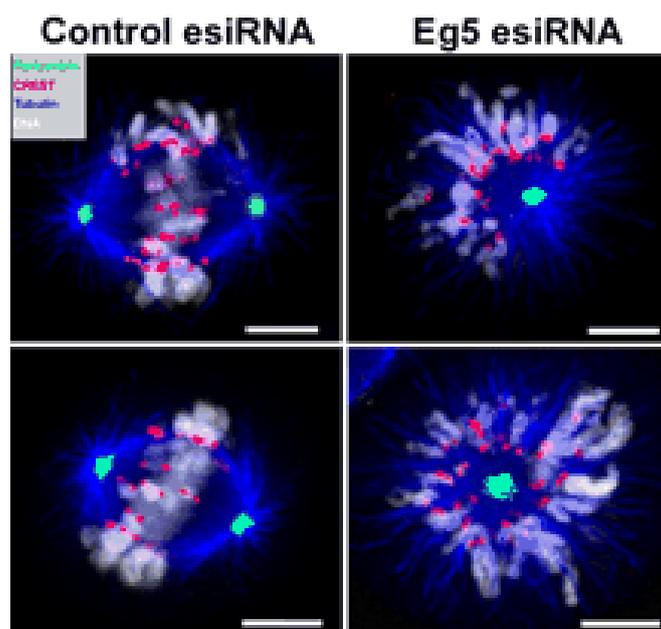


Figure 36: Eg5 est essentielle à la formation du fuseau bipolaire. Les cellules HeLa sont transfectées avec le si ARN anti-Eg5. anti-pericentrin anticorps (vert), ADA (rouge), anticorps anti- α -tubuline (blue), et DAPI (DNA, white). (D'après Zhu 2005).

Ce phénotype de fuseau de mono-astre avec les chromosomes attachés aux MTs émanant d'un centre, est du à l'inhibition de la duplication des centrosomes provoquée par le blocage d'Eg5. De part sa fonction cruciale au sein de la mitose, une expression anormale de cette kinésine provoque des phénotypes dramatiques. Par exemple, il a été montré que la surexpression d'Eg5 provoque des fuseaux monopolaires et multipolaires dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) aboutissant à des erreurs dans la ségrégation des chromosomes. Chez les souris transgéniques (Pim1-Eg5) qui surexpriment Eg5, il y a la formation d'une variété de tumeurs telles que les leucémies et les adénocarcinomes pulmonaires (Castillo et al., 2007).

- **Le monastrol, prototype des inhibiteurs d'Eg5**

Le monastrol a été identifié comme inhibiteur d'Eg5 (Mayer et al., 1999). C'est un inhibiteur allostérique qui n'est pas compétitif avec les sites de liaison aux MTs ou le site de liaison à l'ATP. Il inhibe faiblement et sélectivement Eg5 via sa fixation sur la boucle L5 ce qui en modifie localement le degré de rigidité de la protéine. Celle-ci est alors bloquée dans une conformation non favorable à la libération de l'ADP et perd sa motricité (DeBonis et al., 2003; Maliga et al., 2002). Le blocage chimique de la kinésine par le monastrol inhibe la séparation (et non la duplication) des centrosomes (Kapoor et al., 2000). Il en résulte la formation d'un unique astre de tubules (observé aussi avec l'extinction d'Eg5 par RNAi)

entouré d'un anneau de chromosomes (*figure 37c*). Les cellules traitées avec cet inhibiteur sont dans l'incapacité d'achever leur mitose et sont alors bloquées en prométaphase. Le monastrol n'affecte pas l'organisation de l'appareil de Golgi ou le transport cellulaire (Kapoor et al., 2000). Une distribution normale des microtubules était observée dans les cellules en interphase (*figure 37 b et d*).

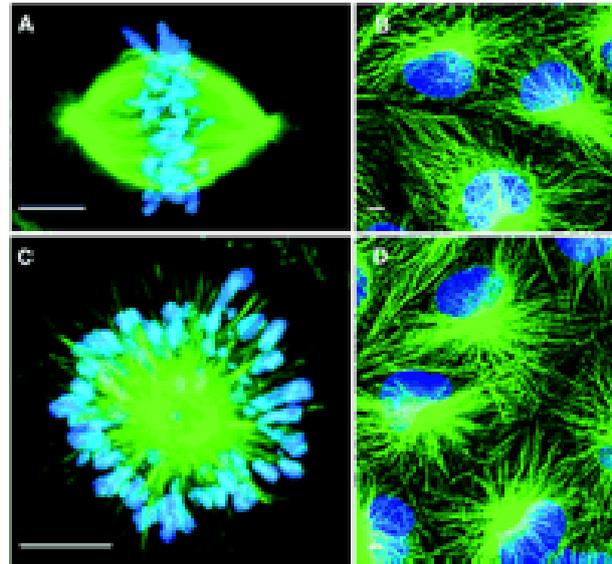


Figure 37: Le monastrol cause des fuseaux monoastraux dans les cellules en mitose. Immunofluorescence marquant en bleu la chromatine et en vert l'alpha-tubuline. Métaphase dans les cellules épithéliales de rein BS-C-1 contrôles (A) et dans les cellules traitées avec 68 μ M de monastrol (C). Interphase des cellules contrôles (B) et traitées au monastrol (D). (*D'après Mayer et al., 1999*).

Cet inhibiteur a été testé sur plusieurs kinésines issues de diverses espèces et il a été montré qu'il n'inhibe pas les autres KIFs. La spécificité de cet inhibiteur pour la kinésine Eg5 est due au fait qu'il cible la longue boucle L5, laquelle est unique parmi toutes les kinésines. De part la forte conservation de la kinésine Eg5 chez les vertébrés, il a été montré que le monastrol inhibe les cellules issues de plusieurs espèces telles que l'homme, le xénope, le poisson zèbre, la souris et le rat (Maliga et Mitchison, 2006).

- **Le diméthylenastron**

Le monastrol a permis la synthèse de nombreux dérivés tels que l'**enastron** et le (7,7-Dimethyl-4-(3-hydroxyphenyl)-5-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahydroquinazolin-2(1H)-thione) connu son nom de **diméthylenastron** (DMN). Ceux-ci provoquent tout comme le monastrol, un unique astre de tubules pendant la mitose (*figure 38b*). Le diméthylenastron est un inhibiteur

allostérique d'Eg5 qui inhibe la kinésine avec une affinité de 200nM. Etant donné l'importance des effets anti-prolifératifs de cet inhibiteur, il a été décrit comme drogue anti-cancéreuses dans le cadre des tumeurs du système nerveux central (Muller et al., 2007) et dans les tumeurs de cancer pancréatique xénogreffées (Liu et al., 2008).

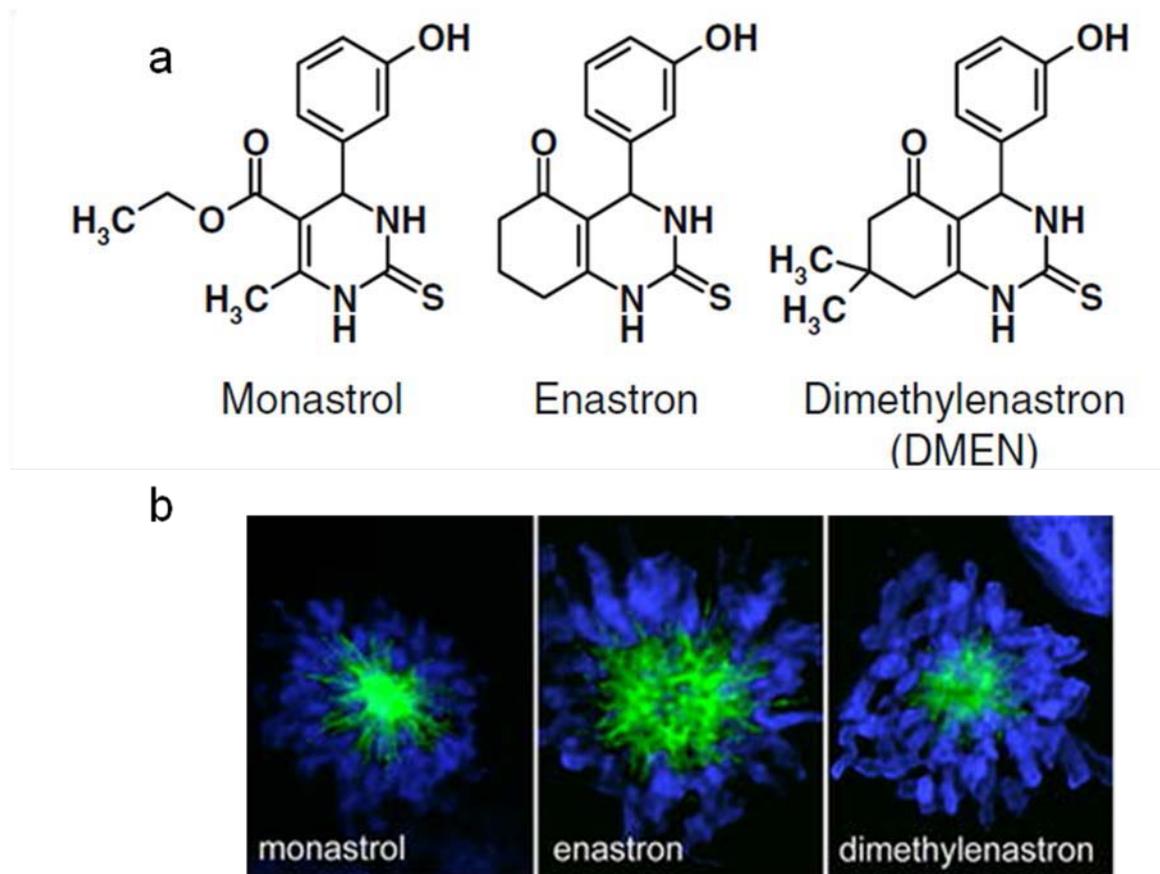


Figure 38 : Le monastrol et deux de ses dérivés l'enastron et le diméthylenastron entraîne la formation du mono-astre. Les structures chimiques du monoastrol et de ses dérivés (a). Formation du mono-astre de tubuline (en vert) et accrochant les chromosomes (en bleu) dans les cellules traitées avec le monastrol et ses deux dérivés. (D'après Muller et al., 2007).

Il a été montré que l'inhibition de la kinésine Eg5 empêche la croissance tumorale via l'induction de l'apoptose (due à l'augmentation de la caspase 3/7) dans ces cellules (Sakowicz et al., 2004; Muller et al., 2007; Valensin et al., 2009).

D'autres inhibiteurs plus affins pour Eg5 ont été synthétisés, parmi eux, l'**ispinesib mesylate** et le **SB-743921**.

- Les inhibiteurs d'Eg5 utilisés en clinique : l'ispinesib mesylate et le SB-743921

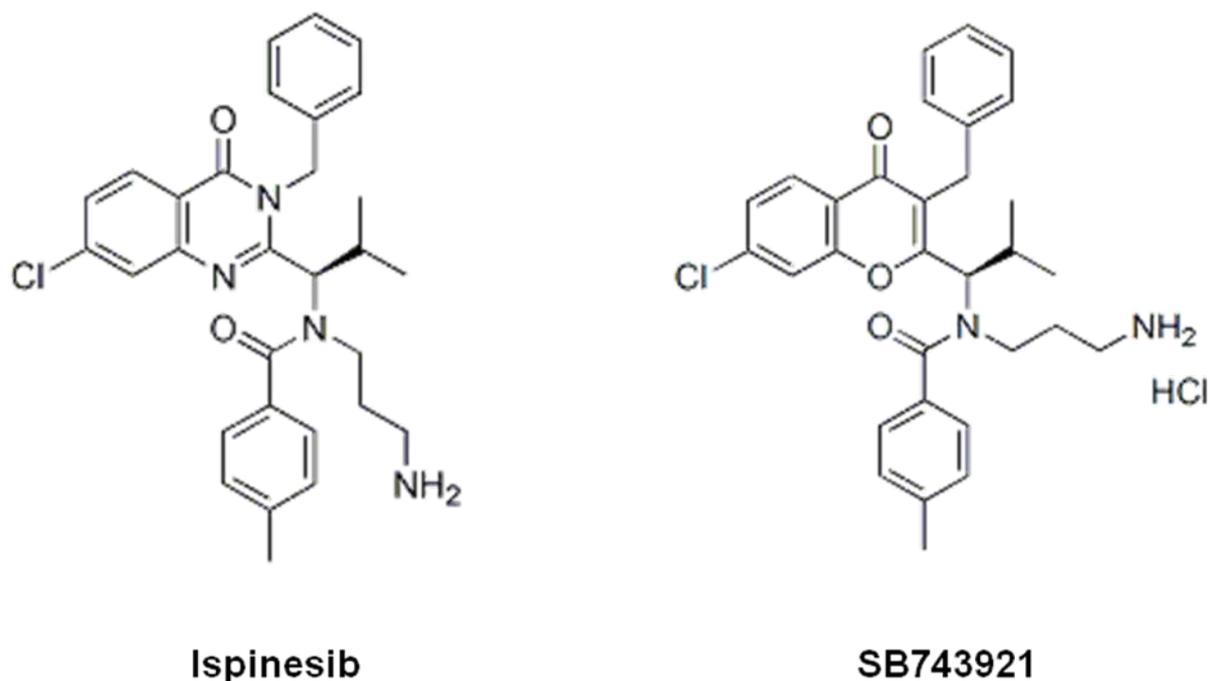


Figure 39: Structure chimique des inhibiteurs d'Eg5, l'ispinesib mesylate et le SB-743921.

L'ispinesib mesylate SB-715992 (CK0238273) est le premier inhibiteur d'Eg5 utilisé dans des essais cliniques. Cet inhibiteur d'Eg5, allostérique et réversible, inhibe la kinésine avec une affinité de 0.6nM en altérant son habilité à lier les MTs et en inhibant son mouvement par le ralentissement de la libération de ADP (Lad et al., 2008). Son affinité cytotoxique inférieure à 10nM dans les lignées tumorales lui confère une activité contre une tumeur de colon xénotransplantée incluant le Colo205 (régression complète), le Colo201 (régression complète) et HT-29 (délai de la croissance tumorale). Dans des modèles de xénotransplants, il a été montré que l'ispinesib induit la régression tumorale de cinq cancers du sein humains incluant les tumeurs MDA-MB-468 particulièrement sensibles à cet inhibiteur. Dans des modèles de cancers du sein surexprimant le facteur de croissance de l'épiderme humain (HER2) tels que KPL4, HCC1954 et BT474, la combinaison de l'ispinesib avec l'herceptine qui cible le HER2 a amélioré le taux d'inhibition de la croissance tumorale (TGI). Dans le cas des tumeurs KPL4, le TGI qui était de 78% pour l'ispinesib seul, 67% pour l'herceptine seul était augmenté à 99% par la combinaison.

Cette molécule a aussi été le sujet de 9 essais clinique en Phase II et 8 essais clinique en phase I ou Ib d'une variété de cancers hématologiques et solides tels que le cancer du sein.

L'évaluation de la phase 1 chez l'enfant avec des tumeurs solides récurrentes. Chez l'adulte, l'ispinesib a été évalué selon une variété de protocoles :

En Juin 2007, Cytokinetics le producteur de cet inhibiteur a rapporté des résultats finaux d'un essai clinique de phase II conçu pour évaluer l'efficacité de l'ispinesib chez les patients ayant un cancer du sein localement avancé ou métastatique, dont la maladie avait récidivé ou progressé malgré un traitement aux anthracyclines et aux taxanes. Dans cet essai, les patients ont reçu l'ispinesib en monothérapie à 18 mg/m² en perfusion intraveineuse de 1 heure tous les 21 jours. Le critère d'évaluation primaire de l'étude était de réponse objective selon les Critères d'Evaluation de la Réponses dans les Tumeurs Solides (RECIST). Des réponses partielles étaient observées dans 4 patients sur 45 évalués et des métastases étaient détectées dans le foie, les poumons et les ganglions lymphatiques. La durée de ces réponses s'est étendue de 6.9 semaines à 19.1 semaines.

Les effets indésirables observés étaient la neutropénie, neutropénie fébrile et de septicémie neutropénique. Par la suite d'autres études présentées au cours de symposiums ont montré que l'inhibiteur était bien toléré lorsqu'il est administré en perfusion intraveineuse de 1 heure les jours 1 et 15 d'un cycle de 28 jours, l'événement indésirable le plus fréquent étant la neutropénie.

Au niveau moléculaire dans les cellules cancéreuses de prostate PC-3, il a été montré que l'ispinesib bloque la prolifération cellulaire et induit l'apoptose en régulant l'expression de gènes qui contrôlent l'apoptose, la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire la signalisation cellulaire tels que EGFR, p27, p15 et IL-11 (Davis et al., 2006).

Le SB-743921 est structuralement distinct de l'ispinesib et possède une affinité plus forte pour Eg5 (0.1nM). Sa spécificité pour Eg5 est 40 000 fois plus élevée que pour d'autres kinésines. L'activité anti-tumorale de SB-743921 a été montrée dans les tumeurs xénogreffées de colon incluant le Colo205 (régression complète), MCF-7, SK-MES, H69, OVCAR-3 (régressions complètes et partielles) et dans les HT29, MDA-MB-231, A2780 (retard de la croissance tumorale). La drogue est aussi efficace dans les souris porteuses de leucémie P388. L'efficacité était dose-dépendante, et dans les modèles de tumeurs les plus sensibles, des régressions ont été observées à des doses faibles (10 mg / kg).

Le SB743821 possède un spectre d'activité important dans les modèles de cancer préclinique mais il fait aussi l'objet d'essai clinique dans le lymphome (Holen et al., 2011). Les études de

toxicité démontrent une neutropénie prévisible et des toxicités gastro-intestinales sans évidence claire de neurotoxicité. La dose recommandée de SB-743921 est 4mg/m² pendant 1h toutes les trois semaines.

Le phénotype des cellules traitées avec les inhibiteurs chimiques d'Eg5 (mono-astre) est comparable à celui observé quand l'expression d'Eg5 est éteinte avec des si ARN (*figure 36*).

Il existe d'autres inhibiteurs d'Eg5 tels que l'AZD4877 qui a montré une activité anti-tumorale dans des xénogreffes. Celui-ci est actuellement utilisé en clinique dans des leucémies myéloïdes, et dans le cancer de la vessie et du colon (Infante et al., 2012; Kantarjian et al., 2012).

4.2) KIF20A/MKLP-2, *Rab6-interacting kinesin-like protein, RAB6KIFL, Rabkinesin-6*

Une forte expression de cette kinésine a été trouvée dans les tissus mitotiquement actifs tels que les testicules, la moelle osseuse et le thymus (Fontijn et al., 2001).

KIF20A a été tout d'abord évalué comme gène suppresseur de tumeurs, candidat dans les leucémies myéloïdes associé à une aberration du chromosome 5. Par la suite, cette kinésine a été désignée comme un candidat prometteur pour être une cible thérapeutique de part sa surexpression dans de nombreux cancers tels que les cancers pancréatique (Imai et al., 2011; Taniuchi et al., 2005), gastrique (Claerhout et al., 2012) et de la vessie (Lu et al., 2010). Récemment, il a été montré que l'induction de l'ARNm de KIF20A dans des hépatocytes stimulés avec un agent mitogène. De plus, le produit de l'ARNm de KIF20A, MKLP-2 est surexprimé dans l'hépatocarcinogénèse (Gasnereau et al., 2012).

Au niveau de sa structure, la kinésine MKLP-2 possède un domaine moteur situé à son extrémité N-Terminale, une région en hélices alpha (domaine coiled coil) et le domaine de la queue à son extrémité carboxyle. Elle possède un site de liaison à la tubuline à ses deux extrémités (*figure 40*).

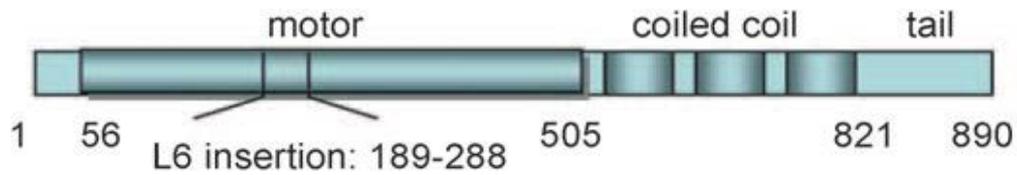


Figure 40: Représentation de la structure de Mklp2. (D'après Tcherniuk et al., 2010).

MKPL-2 contient un domaine L6 d'approximativement 100 acides aminés, unique dans la famille des kinésines-6, dans le domaine moteur. Celui-ci est la cible d'un inhibiteur de cette kinésine, le paprotrain.

Le paprotrain, inhibiteur de MKLP-2

Le premier inhibiteur de MKLP-2, le **paprotrain** pour (PAssenger PROteins TRANsport INhibitor) a été découvert suite au crible de 8900 petites molécules. C'est un inhibiteur réversible non compétitif avec l'ATP (le paprotrain se fixe donc sur MKLP-2 quand l'ATP est fixé pour empêcher la libération de l'ADP) et non compétitif avec les microtubules (il peut donc se fixer sur MKLP-2 liant ou non les MT). Il est considéré comme étant spécifique de MKLP-2 mais ce composé inhibe faiblement 12 autres membres de la famille des kinésines (inhibition inférieure ou égale à 20% à une dose de 50µM) incluant MKLP-1 et MPP1 (M Phase Phosphoprotein 1). L'incubation avec le paprotrain, inhibiteur perméable aux cellules, pendant 8 heures avec des doses situées entre 10µM et 50µM entraîne la formation de cellules binucléées (figure 41).

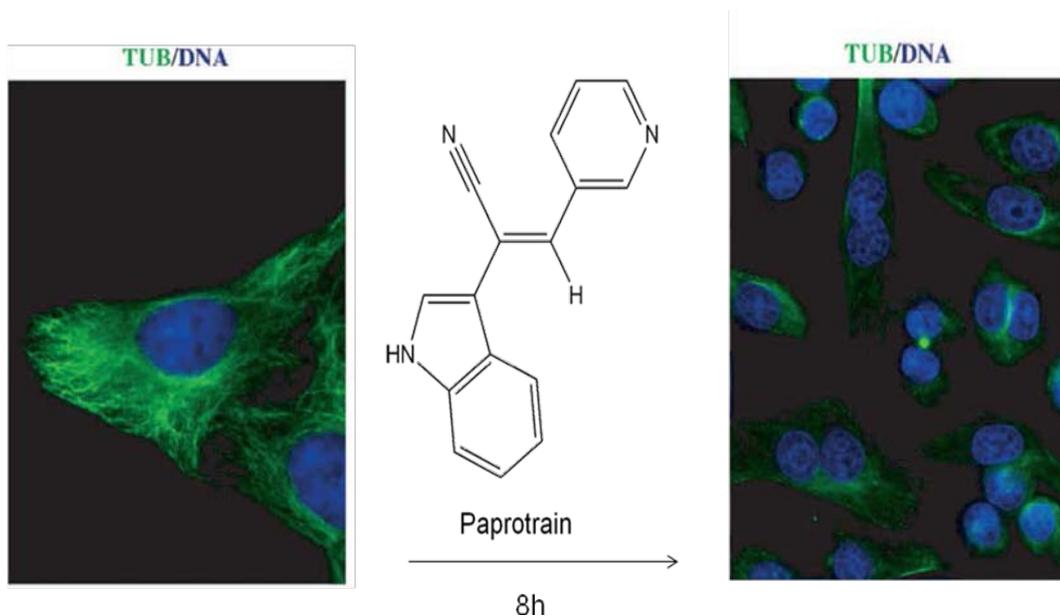


Figure 41: Structure chimique du (Z)-2-(1H-Indol-3-yl)-3-(pyridin-3-yl) acrylonitrile, PAssenger PROteins TRANsport ou paprotrain ; inhibiteur de MKLP-2. (D'après Tcherniuk et al.2010).

Ce phénotype a été également observé avec l'extinction de KIF20A avec un ARN interférent ou avec le blocage de la protéine par un anticorps spécifique (Hill et al., 2000; Zhu et al., 2005). Après 24h de traitement, un nombre significatif de cellules induisent l'apoptose.

La fonction de MKLP-2 est essentielle pour la relocalisation des protéines passagères des centromères à la plaque équatoriale durant la transition métaphase-anaphase. L'inhibition de MKLP-2 par le paprotrain n'affecte pas le recrutement d'Aurora B au niveau des centromères en métaphase, mais inhibe la relocalisation d'AuroraB et de survivine au niveau de la plaque équatoriale en anaphase. Un phénotype similaire est observé dans des cellules suite à une inhibition de MKLP-2 par RNAi. Dans les cellules traitées au paprotrain, Aurora B et survivin sont associées aux chromosomes en anaphase de manière diffuse. L'absence de protéines passagères sur la plaque équatoriale est associée à un défaut de cytokinèse et peut expliquer les cellules binuclées suite à un traitement au paprotrain.

Récemment une étude a montré que la génistéine, un anticancéreux d'origine naturelle, inhibe l'expression de plusieurs kinésines mitotiques incluant KIF20A, KIF22 et KIF23. La kinésine MKLP-2 était la plus fortement diminuée par les doses croissantes de génistéine. Des expériences de surexpression ou d'inhibition de l'expression de KIF20A ont permis de mettre en évidence que le rôle inhibiteur de la génistéine sur la croissance tumorale passerait par l'inhibition de MKLP-2 (Yan et al., 2012).

5) D'autres fonctions pour les kinésines mitotiques

Les kinésines mitotiques sont essentielles à la mitose en participant à divers aspects de la fonction et de l'assemblage du fuseau, néanmoins des fonctions indépendantes de la mitose ont déjà été découvertes pour ces protéines, ne les réduisant plus au seul rôle de moteur cellulaire mitotique. Par exemple, il a été montré que la kinésine Eg5 est requise pour une néosynthèse polypeptidique optimale. Elle est associée avec les ribosomes pendant l'interphase ce qui permet la liaison des ribosomes et des microtubules (Bartoli et al., 2011). Récemment, une étude a montré que le diméthylénastrol inhibe la migration et l'invasion de cellules tumorales pancréatiques PANC-1 ce qui implique un rôle d'Eg5 dans des processus motiles (Sun et al., 2011). Aussi, des études montrent que la kinésine Eg5 agit comme un frein dans les interactions MT-MT dans les neurones en développement. Ce moteur considéré comme lent, ralentit le transport rapide des MTs par les dynéines (Saunders et al., 2007). Ainsi, l'inhibition ou la déplétion d'Eg5 dans des neurones en culture entraîne une

augmentation de la fréquence de transport des MTs aboutissant à une croissance plus rapide de leur axone (Haque et al., 2004; Yoon et al., 2005). Par la suite, il a été montré que ce phénotype induit par l'inhibition d'Eg5 entraîne une augmentation de la vitesse de migration neuronale (Falnikar et al., 2011). Tout comme Eg5, la kinésine KIF15 qui a un rôle assez similaire, est aussi exprimée dans les neurones post-mitotiques (Buster et al., 2003).

KIF20A est localisée au niveau du fuseau central en anaphase mais en dehors de la mitose elle est impliquée dans le transport rétrograde dans le Golgi via une interaction avec la petite GTPase de RAB6 (Echard et al., 1998; Hill et al., 2000).

KIF4A est impliquée dans la réponse aux dommages de l'ADN en modulant la voie BRCA2/Rad51 (Wu et al., 2008). KIF4A permet aussi la survie neuronale en supprimant l'activité enzymatique de PARP-1, connu pour son rôle dans la détection et la signalisation des erreurs de l'ADN pour réparation.

IV. PROJET DE RECHERCHE

Afin de déterminer des nouveaux régulateurs de l'angiogenèse *in vivo*, l'angiogenèse a été induite par application de VEGF-A humain sur la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet. Les ARNm des CAM contrôles et des CAM traitées au VEGF ont été hybridés sur des micropuces à ARN. Ainsi, l'expression des gènes dans les CAM traitées au VEGF a été comparée à celle dans les CAM contrôles par analyse transcriptomique (Affymetrix). Dans les CAM où l'angiogenèse a été induite, 317 sondes ont révélé une surexpression significative comparée aux CAM contrôles. 53 gènes ont montré une expression préférentiellement endothéliale et orthologues à ceux retrouvés chez l'humain a été édifiée. Le VEGF régule des gènes endothéliaux classiquement tels que KDR, PECAM (*Annexe 1, table1*). Parmi les gènes inconnus dans l'angiogenèse, des gènes codant pour les kinésines mitotiques KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A et KIF23 ont été induits par le VEGF.

Du fait de leur surexpression dans de nombreux cancers, les kinésines mitotiques (en particulier Eg5) ont été ciblées à des fins thérapeutiques mais les études sont limitées aux effets de ses inhibiteurs aux cellules tumorales.

De plus, Eg5 est induite par le VEGF *in vivo*, il est donc possible que cette kinésine ait un rôle dans l'angiogenèse, via son action dans les cellules endothéliales ou dans les cellules murales telles que les péricytes ou les cellules musculaires lisses. Ainsi, notre hypothèse est que les inhibiteurs des kinésines n'auraient pas pour seules cibles les cellules tumorales et les vaisseaux tumoraux seraient aussi affectés par les traitements anti-Eg5.

Dans ce contexte, mon projet de recherche a été d'évaluer le rôle des kinésines mitotiques Eg5 et MKLP-2 dans les différentes étapes de la formation des vaisseaux sanguins. Par la suite, l'utilisation de modèles animaux a été requise pour tester les inhibiteurs des kinésines sur l'angiogenèse et la croissance tumorales dans le but de caractériser le profil angiogénique des tumeurs traitées avec des inhibiteurs d'Eg5.

Matériels &
Méthodes

Les tests *in vitro*

1) Cellules primaires et lignées

Les cellules HUVEC « Human Umbilical Vein Endothelial Cell » correspondent à des cellules endothéliales issues du cordon ombilical humain. Elles sont cultivées sur une matrice de gélatine (1%) ou de collagène (100µg/mL) en absence d'antibiotiques. Leur milieu de culture est le « Endothelial Cell Growth Medium » (ECGM, *Promocell*), auquel on ajoute du sérum et des facteurs de croissance fournis avec le milieu. **Les cellules HUAEC** « Human Aortic Endothelial Cell » sont cultivées dans des conditions de croissance équivalente à celles HUVEC.

Les cellules LEC « Lymphatic Endothelial Cell » sont cultivées dans du milieu MV2 (*Promocell*) qui doit être complété par du sérum et des facteurs de croissance.

La lignée cellulaire hCMEC/D3 « human Cerebral Microvascular Endothelial Cell » (*don du Dr. P. O. Couraud, Institut Cochin, Paris*) et le type cellulaire **BEC** « Blood Endothelial Cell » sont cultivées dans un milieu *EBM 2 (Lonza)* complété par un kit *EGM-MV singlequots (Lonza)* nécessaire au maintien du métabolisme basal des cellules.

La culture des hCMEC/D3 nécessite un prétraitement des boîtes de Pétri avec du collagène de type I (100µg/mL) (*BD biosciences*), qui permet l'adhérence des cellules au support, à 37°C 5% CO₂.

Les lignées cellulaires U87 (*ATCC/LGC Promochem, Molsheim, France*), **SF188**, **SF126** et **T98G** issues de gliomes humains, **la lignée cellulaire du gliome 261** et le type cellulaire **ABAE** « Bovin Aortic Endothelial Cell », sont cultivées dans du milieu de culture DMEM «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (invitrogen) qui contient: 4,5g/L D-glucose, 1% L-glutamine, sodium pyruvate. Il est supplémenté avec 10% Sérum de Veau Foetal (SVF), 1% streptomycine/pénicilline, et 0,1% glutamine. Ces cellules peuvent être congelées dans une solution composée de 10% DMSO, 90% de milieu de culture.

La lignée cellulaire Renca est cultivée dans du milieu RPMI. Il est supplémenté avec 10% SVF, 1% streptomycine/pénicilline, et 0,1% glutamine.

2) Test de prolifération

Les cellules sont ensemencées dans une plaque 24 puits en fonction de leur taille et de leur vitesse de prolifération (*tableau 3*).

Type Cellulaire	Hôte	Cellules	Ensemencement (Nombre de cellules/500µL/puits)
Cellules endothéliales	Humain	BEC	20 000
		LEC	25 000
		HUAEC	20 000
		HUVEC	20 000
		hCMECD/3	20 000
	Bovin	ABAE	20 000
Cellules tumorales	Humain	U87	15 000
		T98G	10 000
		SF126	15 000
		SF188	5 000
	Souris	GI261	7 500

Tableau 3 : Conditions de croissance des cellules ensemencées pour le test de prolifération en 24 puits. Abréviations : MV2 :« Microvascular 2 » DMEM «Dulbecco's Modified Eagle Medium».

La plaque est mise à incuber à 37°C, 10% CO₂. 24h plus tard, les cellules sont mises en milieu minimum (sans SVF) pendant 6h puis sont traitées au DMSO (diméthylsulfoxyde : solvant du diméthylénastéron ou DMN) ou avec différentes doses de l'inhibiteur d'Eg5, le DMN (1µM, 750nM, 500nM, 400nM, 250nM, 100nM et 50nM) (*Alexis biochemicals*) dans du milieu de culture complet. Les cellules sont arrêtées après 72h de prolifération puis comptées au Beckman coulter ou placées dans l'Incucyte (*Essen*).

3) Test d'apoptose

Les HUVEC sont ensemencées à 3000 cellules/100µL/puits dans une plaque 96 puits Costar coâtée à la gélatine. 24h après, elles sont traitées avec les inhibiteurs d'Eg5 (DMN, ispinesib, SB) et de MKLP-2 (paprotrain) dans un milieu 2% SVF, 0.1% kit caspase 3 (*Cell Player*). Puis la plaque est placée dans l'Incucyte, lequel mesure la confluence des cellules ainsi que la fluorescence des cellules en apoptose.

4) La migration

Cette expérience est réalisée dans une plaque 96 puits dans laquelle, un tapis confluent de cellules est déposé dans chaque puits. Une fois que les cellules ont adhéré, une cicatrice est réalisée grâce au « wound maker » (*Essen*) (*figure 42*). La plaque est déposée dans l'Incucyte. Les cellules HUVEC sontensemencées à 30000 cellules/100 μ L dans une plaque 96 puits. Elles sont synchronisées 6h en milieu 0% SVF, puis une cicatrice est réalisée dans chaque puits à l'aide du Wound Maker. Les cellules sont rincées avec du milieu 0% SVF avant d'être traitées au DMSO, à l'ispinesib, au SB743921 ou au paprotrain.

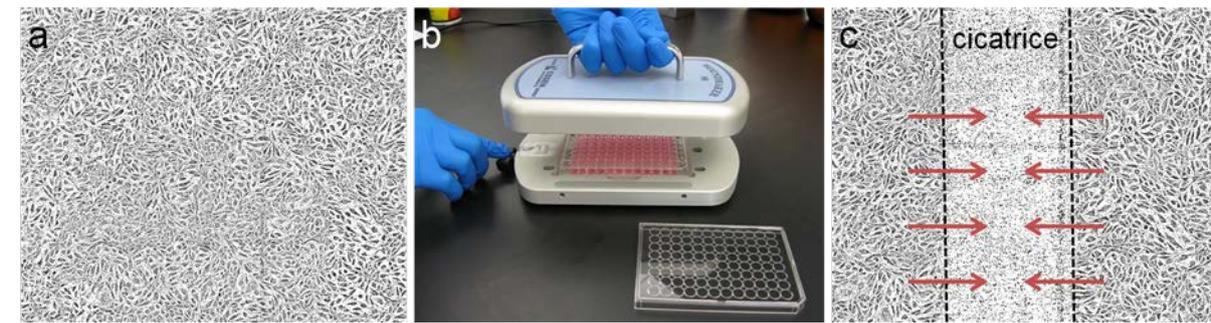


Figure 42: Protocole de migration: cicatrice sur tapis de cellules. Photographie en contraste de phase de cellules HUVEC confluentes dans un puits de plaque 96 puits (a). La plaque 96 puits est placée dans la partie inférieure du wound maker, la cicatrice est réalisée par les pics fixés sur la partie supérieure du wound maker (b). Photographie de la cicatrice réalisée par l'Incucyte (c) les flèches indiquent la migration des cellules.

5) Test d'adhérence

Les cellules semi-confluentes sont traitées pendant 14h30 avec du DMSO, de l'ispinesib 5 μ M et 10 μ M ou du paprotrain 20 μ M dans du milieu HUVEC complet. 200 μ L de chaque matrice (la BSA 5%, le collagène 100 μ g/mL, la fibronectine 0,5 μ g/mL, la laminine 5 μ g/mL et la vitronectine 0,5 μ g/mL) sont déposés dans une plaque 48 puits. La plaque est incubée à 37°C pendant 1h30 afin de permettre la polymérisation des matrices. Pendant ce temps, les cellules avec les différents traitements sont resuspendues dans du milieu traité. Elles sont ensuiteensemencées à 50000cellules/250 μ L de milieu traité et incubées 1h à 37°C. Enfin, les cellules sont rincées au PBS, puis fixées au Méthanol 3minutes et colorées au bleu de Coomassie 30 minutes. Les cellules sont rincées à l'eau, puis observées au microscope inversé Leica.

6) La tubulogenèse

Les tubulogenèses sont réalisées dans des μ -slides (*Biovalley*). Les puits sont coatés avec 10 μ L de matrigel non réduit (*BD Biosciences*) (*figure 43-1*). Afin que cette matrice

polymérise, les plaques sont incubées 30min à 37°C. Puis, les cellules (HUVEC ou Hcmecd/3) sontensemencées à 4000 cellules/50µL dans du milieu 1% pour les HUVEC et dans du milieu 2,5% pour les hcmecd3 avec ou sans traitement (*figure 43-2*). Après 14h30 d'incubation à 37°C, les plaques sont observées au microscope inversé Nikon Eclipse TE200 à l'objectif x4 (*figure 43-3*). La quantification de la tubulogenèse est automatisée et est réalisée par la plateforme Wimasis (*figure 43-4*).

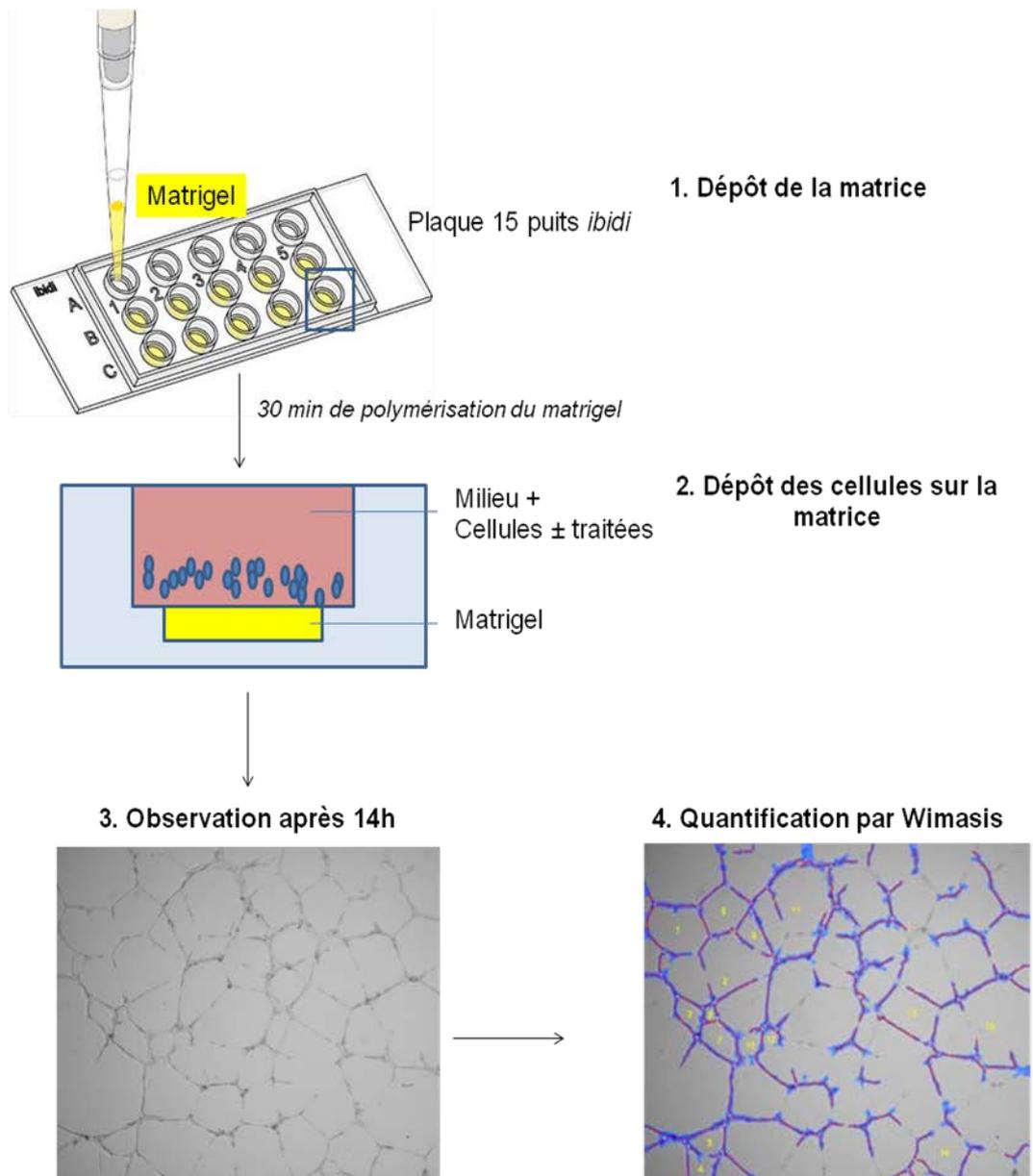


Figure 43: Protocole de formation de tubes *in vitro*. Les tubulogénèses sont observées au microscope inversé.

7) Cytométrie de flux

Après le traitement, les cellules sont rincées au PBS1X, trypsinisées puis centrifugées à 600rpm pendant 10minutes. Elles sont resuspendues dans 1,5mL de PBS puis transférées dans un tube pour être centrifugées à 600 rotations par minutes (rpm) durant 5 minutes. Ensuite les cellules sont fixées dans une solution froide d’Ethanol 70°/PBS. Les cellules sont à nouveau centrifugées à 600rpm pendant 5 minutes. Enfin, les cellules sont reprises dans du PBS 2%SVF et de 0.5 à 1µg de DAPI/mL. Le marquage dure 1h à RT puis les échantillons sont placés dans la glace avant d’être analysés avec l’Analyseur BD FACSCanto II (*BD Biosciences*).

La quantification des protéines : le Western blot et les puces à anticorps

1) Préparation des échantillons

1.1) Extraction des protéines

L’extraction est réalisée à 4°C afin de réduire l’activité des protéases. Les cellules sont rincées avec du PBS puis elles sont solubilisées dans du tampon de lyse à un volume de 1mL pour dix millions de cellules (1% NP-40, 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 137mM NaCl, 10% glycérol, 2mM EDTA et un cocktail d’inhibiteurs de protéases *Roche*). Elles sont ensuite placées à 4°C sous agitation pendant 30 minutes. Le lysat des cellules est alors récupéré dans un tube à l’aide d’un grattoir. Dans le cas de la récupération de protéines sur des tumeurs isolées, celles-ci sont broyées dans le tampon de lyse. Les tubes sont centrifugés à 13 000rpm pendant 10min afin de trier les débris cellulaires et le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les échantillons protéiques peuvent être directement dosés ou être conservés à -80°C.

1.2) Dosage de Bradford

La concentration en protéines est déterminée grâce au **réactif de Bradford**. Pour cela une gamme de BSA (10µg/mL, 20µg/mL, 40µg/mL, 60µg/mL, 80µg/mL et 100µg/mL) et différents volumes d’échantillons sont déposés en duplicat dans une plaque 96 puits. Puis 100µL de réactif de Bradford sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est lue au lecteur de

plaque à une longueur d'onde de 560nm. La concentration des échantillons est déterminée en comparant leur coloration à celle de la gamme.

2) Western blot

2.1) Préparation des gels

Les gels de migration (concentration et séparation) sont préparés : le gel de séparation 10% (Acrylamide 30%, Eau mQ, Tampon Tris pH8,8 1,5M, SDS 10%, APS10% et Temed) est coulé entre des plaques de verre fixées sur un support. Une fois polymérisé le gel de concentration (4%) (Acrylamide 30%, Eau mQ, Tampon Tris pH8,8, SDS 10% 0,5M, APS10% et Temed) est coulé et un peigne est enchâssé entre ces plaques.

2.2) Préparation des échantillons protéiques

Une solution contenant 50µg de protéines et 1/5^{ème} de Laemmli est chauffée à 100°C pendant 5 minutes ce qui dénature les protéines en brisant les faibles liaisons intramoléculaires. Les solutions sont ensuite centrifugées 2 minutes à 14 000g à 4°C.

2.3) Migration des protéines

La migration s'effectue dans une cuve contenant un tampon de migration (SDS, Tris-Glycine) Enfin, les échantillons sont déposés dans chaque puits. Les protéines migrent avec un courant de 50 Volts dans le gel de concentration et à 80 Volts dans le gel de séparation.

2.4) Transfert des protéines sur membranes

Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique de 100V est appliqué. Les protéines chargées négativement migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Le transfert est réalisé dans du tampon de transfert (SDS, Tris-Glycine et 20% d'éthanol) maintenu à 4°C à l'aide d'un glaçon.

2.5) Incubation des anticorps

Les membranes sont rincées dans du PBS puis bloquées avec le tampon Odyssey pendant 1h à température ambiante. Les anticorps sont préparés dans le tampon Odyssey avec 0,1% de

Tween20 puis ils sont incubés avec la membrane une nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont rincés trois fois au PBS Tween puis les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaires couplés à des fluochromes IrDye .

2.6) Révélation

Les membranes sont rincées trois fois au PBS Tween et une fois au PBS avant d'être scannées LI-COR Odyssey Infrared Imaging System.

3) Les puces à anticorps

3.1) Préparations des membranes

Les membranes sont préparées selon le protocole (*R&D Systems*) fourni avec le kit. 2mL de tampon bloquant sont déposés dans la plaque 4 puits. A l'aide d'une pince plate, les membranes sont placées dans les puits et incubées 1h sur une plateforme mouvante. Pendant le blocage des membranes, 1mL de chaque échantillon protéique (50µg dilué dans le tampon bloquant) puis 15µL de la mixture d'anticorps sont ajoutés à 0.5mL de tampon 4. Les solutions sont incubées 1h à température ambiante afin de permettre la fixation des anticorps aux protéines. Le tampon bloquant des membranes est remplacé par les solutions d'échantillons et d'anticorps. Après une nuit d'incubation à 4°C, les membranes sont rincées trois fois 10 minutes dans le tampon de lavage.

3.2) Révélation

La streptavidine IRDye® 800CW est diluée dans le tampon de blocage fourni avec le kit et 1.5ml de cette solution est déposée dans la plaque 4 puits (préalablement rincée à l'eau distillée). Chaque membrane est précautionneusement transférée de son récipient de lavage vers la plaque 4 puits, puis est incubée 30 minutes sur une plateforme mouvante. Enfin, les membranes sont rincées trois fois 10 minutes dans le tampon de lavage puis observées avec l'Odyssey.

3.3) Analyses des puces

La fluorescence de chaque spot est quantifiée grâce au logiciel de l'Odyssey.

Modèles d'étude *ex vivo*

1) La culture d'anneaux aortiques

Cette manipulation est réalisée en condition stérile. Les souris C57Bl6 âgées de 3 semaines sont sacrifiées par dislocation cervicale. Elles sont fixées sur un support et ouvertes. L'aorte est dégagée puis prélevée. Elle est ensuite placée dans une boîte de culture contenant du milieu EBM2 complet (*Promocell*) et des antibiotiques (Pénicilline/streptomycine 1/25^{ème}) pour y être nettoyée. Le tissu conjonctif, comprenant une enveloppe graisseuse entourant l'aorte est disséqué et les caillots de sang sont expulsés à l'aide d'une seringue. L'aorte est déposée sur un support sec, puis sectionnée transversalement à l'aide d'un scalpel. Les anneaux sont déposés un à un dans 35µL de matrigel réduit (*BD Biosciences*) dans une plaque 48 puits (*Nunc*). Ils sont mis à incuber pendant 1h pour que le matrigel polymérise (37°C, 5% CO₂). Enfin 300µL de milieu EBM2 complet sont déposés doucement dans le puits et les anneaux aortiques sont replacés dans l'incubateur. Le milieu des aortes est changé tous les jours afin de permettre un apport nutritif régulier. Les aortes sont traitées avec du DMSO ou avec les inhibiteurs des kinésines (DMN, ispinesib, paprotrain) dès le premier jour d'incubation ou après trois jours. Les photos sont prises au microscope (*Nikon*) à partir de 3 jours d'incubation et pendant 4 jours afin de suivre la migration des CE.

Pour les immuno-marquages sur les anneaux aortiques, ceux-ci sont cultivés sur une matrice de collagène (100µg/mL).

Modèles d'étude *in vivo*

1) Le glioblastome sur la CAM

1.1) L'ouverture des œufs

Les œufs fécondés sont fournis par *Cerveloup*. Ils sont nettoyés avec un chiffon humide et mis à incuber à 37,2°C et à 80% d'humidité pendant trois jours.

Après 3 jours de développement, les œufs sont sortis de l'incubateur et disposés sous la hotte. Chaque œuf est percé au niveau de la base pour permettre l'introduction d'une seringue (*figure 44a*). 7mL de blanc sont prélevés pour abaisser le niveau de l'embryon. L'ouverture est bouchée à l'aide d'un adhésif (*figure 44b*). Afin d'éviter que des morceaux de coquilles ne tombent sur l'embryon un adhésif est placé sur la partie haute de l'œuf ; puis celui-ci est à nouveau percé pour faciliter la découpe d'une partie de la coquille (*figure 44c-d*). La présence

de l'embryon et ainsi que sa viabilité sont vérifiées et 5mL de blanc sont réinjectés dans l'œuf (*figure 44e*). Si des bulles se sont formées, elles sont éclatées avec un coton stérile. Un adhésif permet la fermeture de l'œuf puis celui-ci est replacé dans l'incubateur (*figure 44f*).

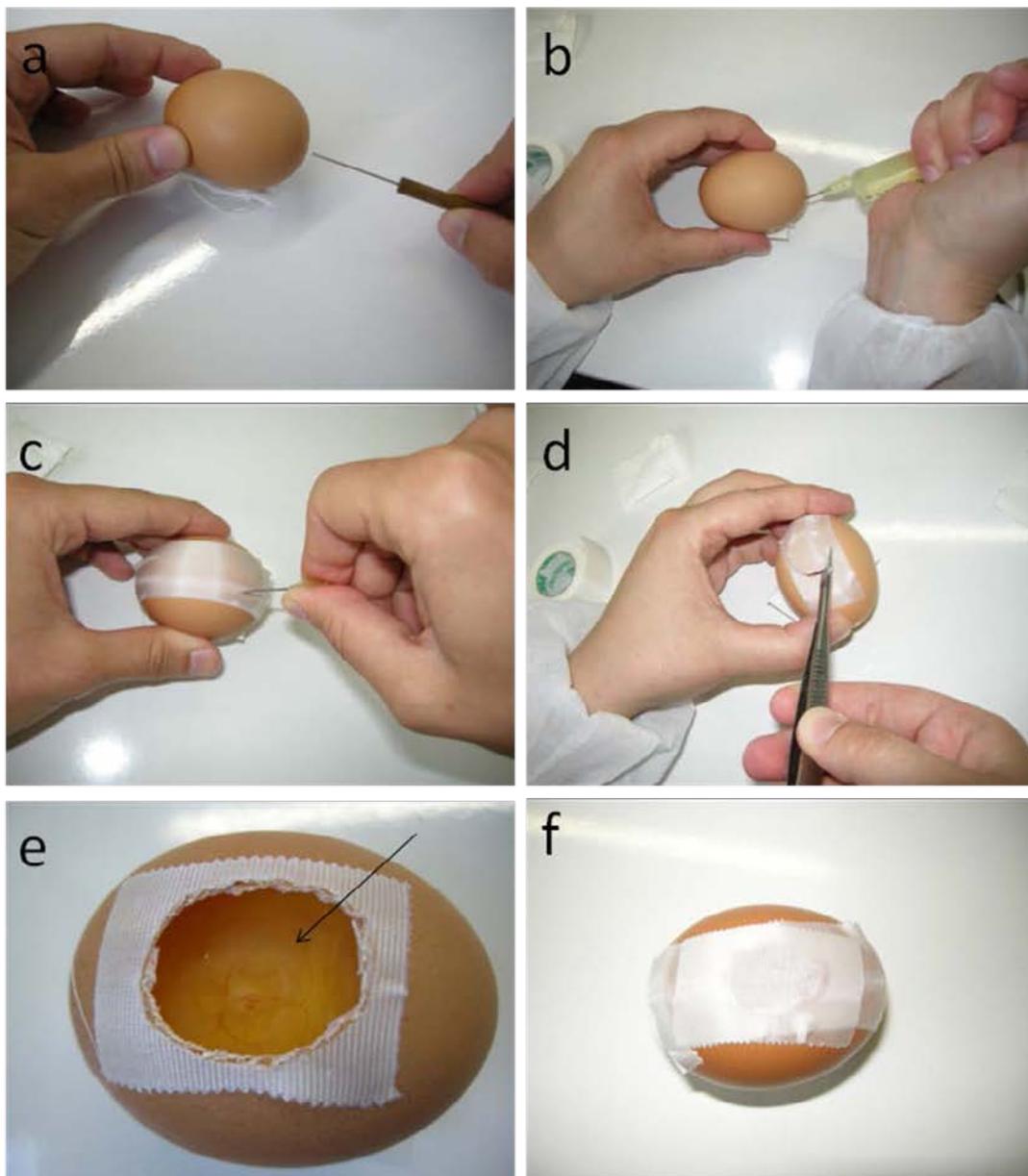


Figure 44 : Protocole d'ouverture des œufs de poulet 3 jours post-incubation. La flèche indique l'embryon viable.

1.2) Implantation des cellules tumorales

L'implantation des cellules tumorales se fait au stade embryonnaire E9. Afin de contrôler la localisation et la taille des tumeurs, les cellules tumorales sont injectées dans un anneau de polyéthylène préalablement déposé sur la CAM d'embryon de poulet. La CAM est blessée au scalpel et 3 millions de cellules U87 dans 20 μ L de milieu sont déposées dans les anneaux.

1.3) Fixation et inclusion des tumeurs

Après 4 jours de traitements, les embryons sont fixés avec 3mL de PAF 4% pendant 30 minutes. Puis le PAF est enlevé pour faciliter la découpe des tumeurs entourées de CAM, à l'aide de ciseaux et d'une pince fine. Les tumeurs sont rincées dans du PBS 0,1M. Elles sont ensuite cryoprotégées par immersion séquentielle dans du sucrose 15% pendant 24h puis dans du sucrose 30%. Chaque tumeur est incluse dans un milieu (Tissue Tek O.C.T) puis placée pendant quelques minutes dans l'isopentane ce qui permet de diminuer la température de façon homogène. Les blocs sont conservés à -80°C.

1.4) Histologie

Des coupes de 8µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide du cryostat *Leica*. Les lames sont conservées au -80°C.

Une coloration hématoxyline-éosine est réalisée sur les coupes de tumeur. Les lames sont sorties du congélateur au -80°C et séchées à température ambiante. Elles sont fixées à l'éthanol 70° pendant 30 secondes puis rincées à l'eau distillée pendant 30 secondes. La coloration à l'hématoxyline (ou hemalaun mayer) dure 30 secondes puis est rincée à grande eau pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite déposées dans un bain d'éosine/éthanol 70° pendant 30 secondes. Enfin, les lames sont déshydratées par passage dans des bains successifs d'éthanol 70°, 85°, 90° et 100°.

1.5) Immuno-histochimie

Les lames sont séchées durant 15 minutes. Les coupes sont fixées avec du PAF 4% durant 10min. Puis, 3 lavages de 5minutes au PBS 0,1X sont réalisés. Les coupes de tumeurs sont perméabilisées au PBS Triton. Les sites non spécifiques sont saturés avec de la BSA 5% en PBS (1h). Enfin, les anticorps primaires sont incubés sur la nuit à 4°C. Les anticorps primaires sont ensuite rincés au PBS (3x5min). Ensuite les anticorps secondaires sont déposés pendant 1h à température ambiante en chambre humide. Les anticorps secondaires sont rincés au PBS (3x5min). Le marquage au DAPI 1/2000 est effectué pendant 10minutes à température ambiante et à l'obscurité. Puis les coupes sont rincées au PBS. Enfin, les lames sont montées avec du Prolong Gold (*INTERCHIM P-36930*) et séchées à température ambiante pendant 12h.

2) Xénogreffe de cellules cancéreuses chez la souris

Avant les implantations, les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 90 μ L d'anesthésiant (soit 1.5mg/kg de Kétamine et 150 μ g/kg de Xylazine).

2.1) Injection intra-crâniale des cellules de glioblastome.

Les souris Rag-gamma sont maintenues dans le cadre stéréotaxique grâce à des barres d'oreilles appuyées contre leur temple et une « pièce de gueule » fixant leur rostre. Leur crâne est dévoilé par une incision au sommet de la tête puis aseptisé avec de la bétadine (*figure 45a*).

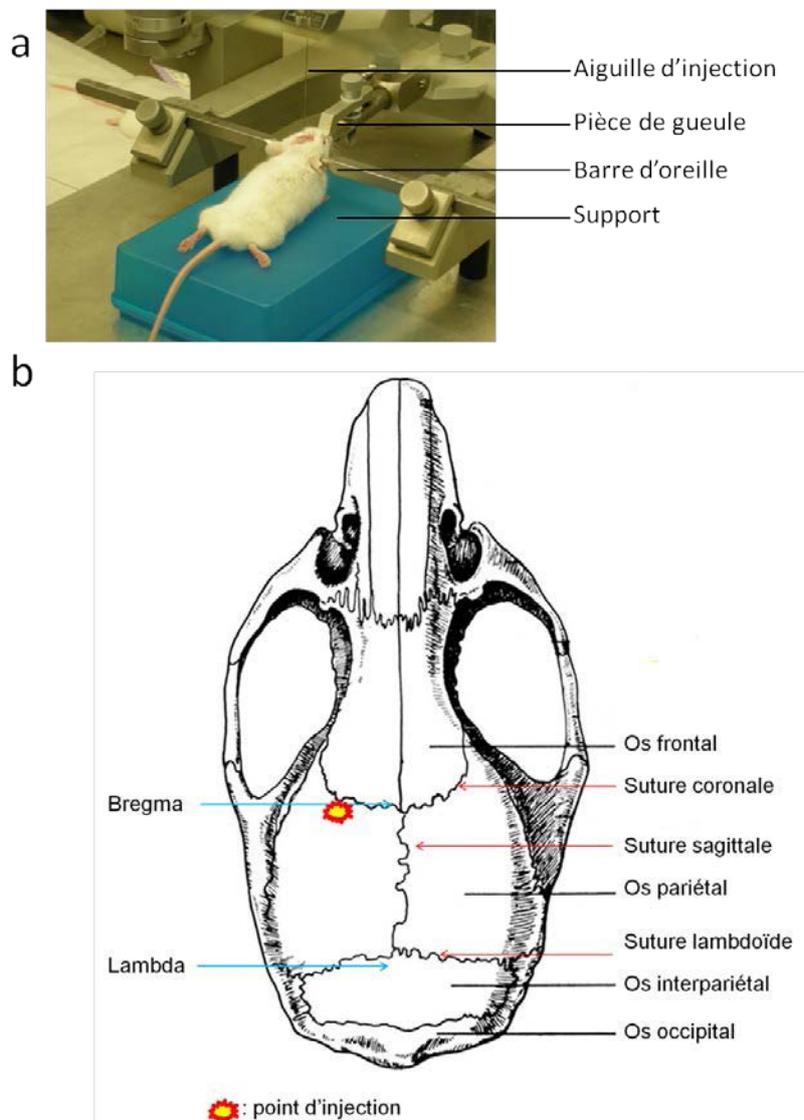


Figure 45: Injection des U87 dans le cerveau de souris immunodéficiente. Positionnement de la souris dans l'appareil stéréotaxique (a). Représentation du point d'injection des cellules tumorales U87 (b).

Les coordonnées d'injection sont calculées à partir de sutures qui séparent les différents os du crâne (*figure 45b*). Elles permettent d'identifier le bregma et le lambda à partir desquelles est calculé le point d'injection.

- Le **bregma** est le point qui relie la suture coronale (la suture entre l'os pariétal et l'os frontal) à la suture sagittale (la suture entre les deux os pariétaux, sur la ligne médiane).

- Le **lambda** est l'intersection entre la suture lambdoïde (la jointure transversale entre l'os occipital et les os pariétaux) et la suture sagittale.

Le crâne est percé à l'aide d'une seringue.

La seringue d'injection est positionnée dans le cerveau à $-0.1\mu\text{m}$ du bregma, 2,2 mm sur la gauche et à 3mm de profondeur et les 300 000 cellules de glioblastomes U87 sont injectées.

Les traitements commencent trois jours après implantation et 4 groupes de souris sont formés :

- un groupe témoin correspondant aux souris qui ont reçu le solvant de l'ispinesib (80% D5W, 10% EtOH, 10% Cremophorl-El), l'avastin étant déjà repris.
- un groupe de souris traitées à l'Avastin à une dose de 10mg/kg,
- un groupe de souris traitées à l'ispinesib à une dose de 10mg/kg
- un groupe de souris traitées avec la combinaison Avastin + ispinesib

Les traitements sont injectés en intra-péritonéale à une fréquence de 2 fois par semaine. Après 25 jours, les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale et la tumeur est prélevée et pesée.

2.2) Le carcinome rénal

Une lignée cellulaire murine de carcinome à cellules rénales claires exprimant la Luciférase (RENCA-Luc) est injectée en sous-capsulaire rénal à des souris Balb-C afin de créer un modèle murin syngénique orthotopique de cancer du rein.

Le protocole d'injection sous-capsulaire rénale de suspension cellulaire suivant est utilisé sur les souris: sous anesthésie générale par xylazine/kétamine, les souris sont positionnées en décubitus latéral droit. L'abord du rein est réalisé par une incision de lombotomie gauche. Après libération de sa loge, le rein gauche est délicatement tracté sur son pédicule et extériorisé. L'injection de 10^5 de cellules Renca dans un volume de $25\mu\text{L}$ est réalisée en sous-capsulaire à l'aide d'une aiguille de 27 Gauge. La visualisation en trans-capsulaire de la suspension cellulaire déposée est le témoin de la réussite de la procédure. Après contrôle de

l'absence de saignement au point d'injection, le rein est repositionné dans sa loge. Le péritoine et la peau sont recousus et les animaux sont placés dans une cage chauffée.

Les traitements commencent 3 jours après implantation des cellules tumorales et 4 groupes de souris sont formés :

- un groupe de souris traitées avec le solvant de l'ispinesib mesylate (80% D5W, 10% EtOH, 10% Cremophorl-El, DEC)
- un groupe de souris traitées avec l'ispinesib mesylate (5mg/kg)
- un groupe de souris traitées avec le solvant du SB-743921 (Diacétylacétamide, DA)
- un groupe de souris traitées avec le SB-743921 (5mg/kg).

Les drogues sont injectées en sous cutanée à une fréquence de 2 fois par semaine. Les animaux bénéficient d'un suivi par bio-luminescence afin d'évaluer la croissance tumorale et la dissémination métastatique, ceci tous les 2 jours après implantation et jusqu'au sacrifice.

Sous anesthésie gazeuse par Isoflurane 2% et immédiatement après injection de 100µL de D-Luciférine Fluoprobes®, les souris sont placées dans l'imageur photonique (Biospace Lab®) en décubitus ventral pour une acquisition rénale, et en décubitus dorsal pour l'acquisition en regard des aires hépatique et pulmonaire (*figure 46*).

Post-implantation

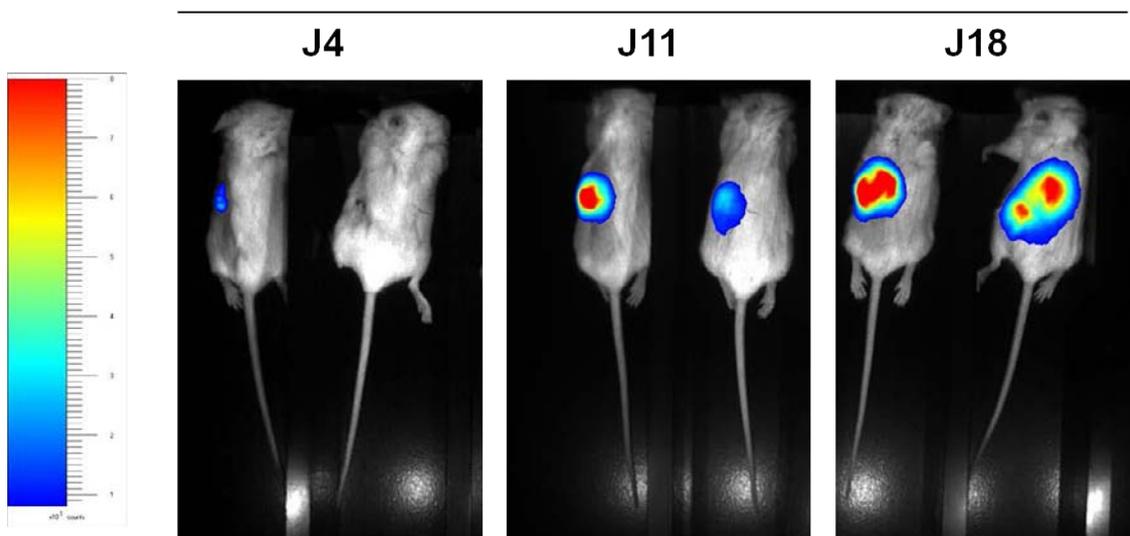


Figure 46: Suivi par bioluminescence du volume tumoral grâce aux Renca-luciférase. Les tumeurs Renca sont observées au biospace après injection de luciférine en intrapéritonéal.

Après sacrifice par dislocation cervicale, les animaux feront l'objet d'une thoracolaparotomie pour prélèvement sanguin intra-cardiaque, et exploration thoracique et

abdominale à la recherche des tumeurs rénales et de métastases. Les organes tumoraux seront ensuite inclus pour moitié en OCT et l'autre moitié étant directement plongé dans l'azote puis conservée à -80°C pour extraction protéique.

Les tumeurs incluses en OCT seront exploitées par immunofluorescence et coloration H&E selon les protocoles décrits.

Divers anticorps ont été utilisés pour les immuno-marquages sur cellules ou tissus et sont répertoriés dans le tableau 4. La spécificité de certains anticorps a été réduite aux espèces qui nous intéressent, l'humain et le murin. De même, les applications de certains anticorps (Immuno-blot, Immunohistochimie, Immunofluorescence, test ELISA) a été restreinte aux utilisations que nous avons faites.

protéines	fournisseur	référence	hôte	spécificité	WB	IF
Actine	<i>Santa cruz</i>	sc-1616	chèvre	humain	1/1000	
CD31	<i>BD Pharmingen</i>	01951D	rat	murin		1/100
Endogline	<i>BD Pharmingen</i>	555690	rat	murin		1/100
GFAP	<i>Dako</i>	Z0334	lapin	humain, murin		1/400
KIF11/Eg5	<i>Abcam</i>	ab61199	lapin	humain	1/500	
KIF11/Eg5	<i>Abcam</i>	ab37009	lapin	humain	1/500	
KIF11/Eg5	<i>Novus Biological</i>	NB500-181	lapin	humain, murin		1/1000
KIF11/Eg5	<i>BD Biosciences</i>	611186	souris	humain	1/1000	1/100
KIF15	<i>Santa cruz</i>	sc-100948	souris	humain	1/500	1/200
KIF15	<i>Tebu-bio</i>	AKIN13	lapin	humain, murin	1/200	1/200
KIF20A/MKLP2	<i>Santa cruz</i>	sc-104954	souris	humain		1/500
KIF20A/MKLP2	<i>Abnova</i>	PAB18406	lapin	humain		1/100
NG2	<i>Millipore</i>	AB5320	lapin	humain, murin		1/200
VE- Cadherine	<i>Santa cruz</i>	sc-6458	chèvre	humain, murin		1/1000
Vinculine	<i>Sigma</i>	V9131	souris	humain	1/500	
Vimentine	<i>Interchim</i>	NB200-622	souris	humain		1/400
Tubuline	<i>Sigma</i>	T5168	souris	humain	1/1000	1/1000

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés.

Quantifications et analyses statistiques

Méthodes de quantification des cellules migrantes positives pour Eg5.

Une aire entourant la cicatrice et correspondant à la moitié de l'aire totale est sélectionnée. Le nombre de cellules positives pour Eg5 est relativisé en fonction du nombre de cellules totales. Les cellules en mitose sont exclues.

Tests en aveugle

L'utilisation des tests en aveugle a été requise pour quantifier la vascularisation des glioblastomes implantés sur la CAM et des tumeurs Renca. Dans ces tests, les tumeurs ont été classées selon leur niveau de vascularisation (2 ou +++) pour les tumeurs hautement vascularisées, (1 ou ++) pour les tumeurs moyennement vascularisées et (0 ou +) pour les tumeurs peu vascularisées.

Analyses statistiques

Les valeurs pour chaque échantillon correspondent à la moyenne \pm SEM. Le nombre d'échantillon (n) et la probabilité (p) sont indiqués sous les graphiques. La signification statistique est évaluée par un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis qui permet de comparer plusieurs échantillons indépendants. Ce test est complété avec un post test de Dunn qui permettra de comparer les échantillons deux à deux.

Résultats discutés

I. Rôle des kinésines mitotiques dans l'angiogenèse physiologique

1) Expression et caractérisation des kinésines mitotiques *in vitro* et *in vivo*.

1.1) La kinésine mitotique KIF11/Eg5/KSP

Eg5 dont le gène (KIF11) a été induit par le dépôt de VEGF sur la CAM, constitue le principal candidat de notre étude sur l'implication des kinésines mitotiques dans l'angiogenèse (*Annexe 1*).

Dans les CAM traitées au VEGF, les analyses qRT PCR montrent une induction de 3.68 des ARNm de KIF11. La majorité des expériences étant réalisées sur des cellules endothéliales HUVEC, l'induction de la protéine Eg5 avec le VEGF a donc été testée dans ce type cellulaire. Après 24h de traitement avec le VEGF (50ng/mL), les HUVEC surexpriment Eg5 d'un facteur 3,2 par rapport à la condition contrôle (Milieu 0.2%). Cette induction est réprimée d'un facteur 4,8 par l'anticorps bloquant du VEGF, l'Avastin. L'expression d'Eg5 est aussi induite dans le milieu complet (Milieu 2%) qui contient de multiples facteurs de croissance (*figure 47*).

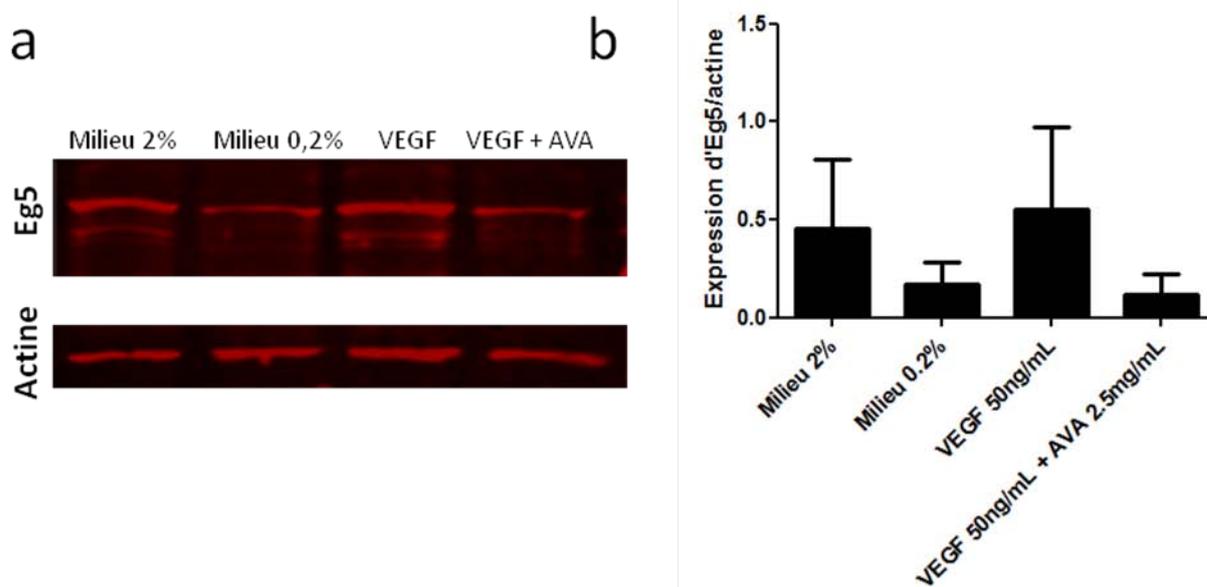


Figure 47: Le VEGF induit l'expression d'Eg5 dans les HUVEC. Scan du Western blot (a). Quantification du Western blot (b).

L'expression d'Eg5 dans les HUVEC a été comparée à celle des cellules de glioblastome U87. Pendant l'interphase, un marquage punctiforme d'Eg5 est retrouvé au niveau du cytoplasme des cellules HUVEC et U87 (*figure 48a et d*). La kinésine est relocalisée au niveau du fuseau mitotique pendant la métaphase (*figure 48b et e*). Eg5 est fortement exprimée au niveau de l'anneau contractile et se relocalise dans les cytoplasmes des futures cellules filles lors de la cytotéièse des HUVEC (*figure 48c*). L'expression de cette kinésine est similaire entre les HUVEC et les U87 et correspond à celle décrite dans d'autres cellules tumorales telles que les cellules Hela (Blangy et al., 1995).

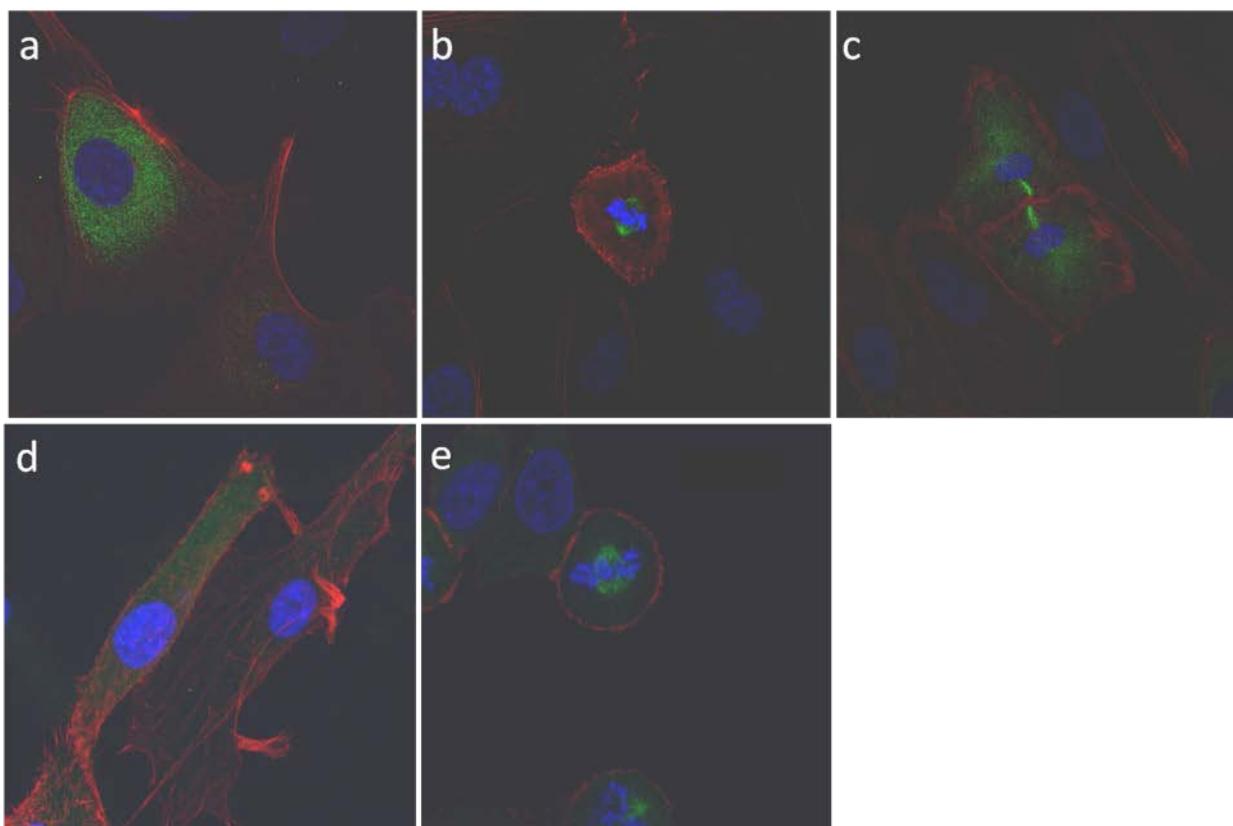


Figure 48 : Expression d'Eg5 au cours du cycle cellulaire dans les cellules endothéliales HUVEC et les cellules tumorales U87. La kinésine Eg5 est marquée en vert, l'actine en rouge et le noyau en bleu. L'expression d'Eg5 est observée dans des HUVEC (a) et des U87 (d) en interphase respectivement (a) et (d), en métaphase (b) et en cytotéièse (d).

Ces immuno-marquages suggèrent que la kinésine Eg5 conserve sa fonction de « kinésine des fuseaux » dans les CE.

Des analyses visant à comparer l'expression d'Eg5 dans les vaisseaux sanguins et dans les vaisseaux lymphatiques, ont été réalisées par l'équipe de Joerg Wilting avec laquelle nous collaborons. *In vitro*, les taux d'ARNm de KIF11 dans les HUVEC sont plus importants que

dans les LEC (*Annexe 1, figure 2c*). Dans les vaisseaux de la peau humaine, l'expression d'Eg5 est forte dans les vaisseaux sanguins et dans les vaisseaux lymphatiques (*Annexe 1, figure 2a-b*).

L'expression d'Eg5 a été comparée dans différentes cellules tumorales. Eg5 est sous forme de deux bandes une à 130kDa et l'autre à 140kDa pour les cellules U87, GL261, MG63, T47D, HS578T et Hela. Les Renca, SF126, SF188 possèdent une bande à 160kDa au lieu de celle à 140kDa observée dans les autres cellules. Ces deux bandes sont susceptibles de correspondre aux deux dimères qui composent la kinésine. L'expression d'Eg5 est très forte dans les cellules Renca et SF188 ce qui pourrait suggérer qu'elles seront plus sensibles aux traitements anti-Eg5.

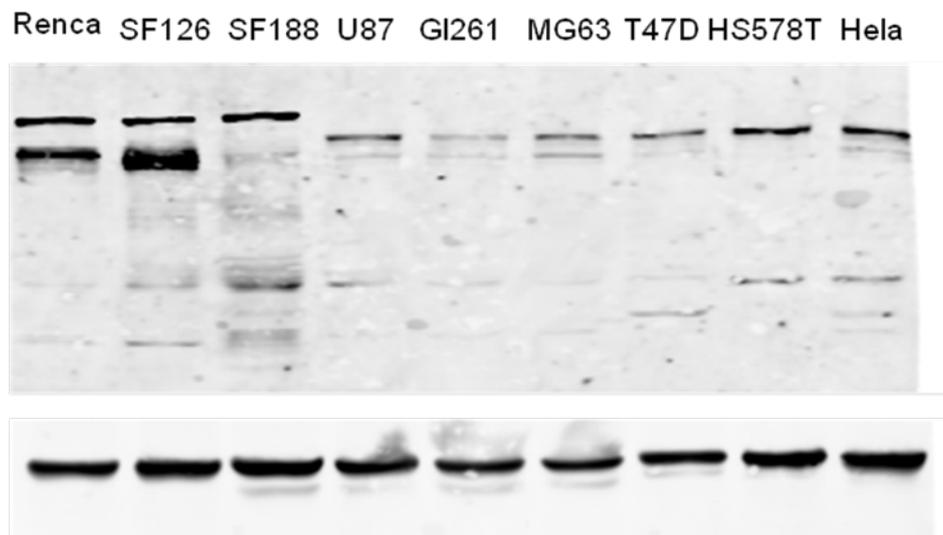


Figure 49 : Immuno-blot d'Eg5 dans différents types cellulaires tumoraux. L'expression d'Eg5 a été comparée dans des lignées cellulaires issues de glioblastomes humains (U87, SF126 et SF188), d'un glioblastome murin (GL261), d'ostéosarcomes humains (MG63), de carcinomes mammaires humains (T47D et Hs578T) et d'un cancer utérin (Hela).

Une deuxième kinésine dont l'expression a été induite par le VEGF a été étudiée au cours de cette thèse.

1.2) La kinésine mitotique KIF20A/MKLP-2

En fin de mitose, MKLP-2 est fortement exprimée au niveau de l'anneau contractile des cellules HUVEC (*figure 50a*) ce qui correspond à l'expression de cette kinésine décrite dans les cellules Hela (Neef et al., 2003).

La kinésine MKLP-2 est fortement exprimée dans la vésicule allantoïdienne par rapport aux autres tissus de l'embryon de poulet suggérant un rôle de cette kinésine dans cet organe. (figure 50b)

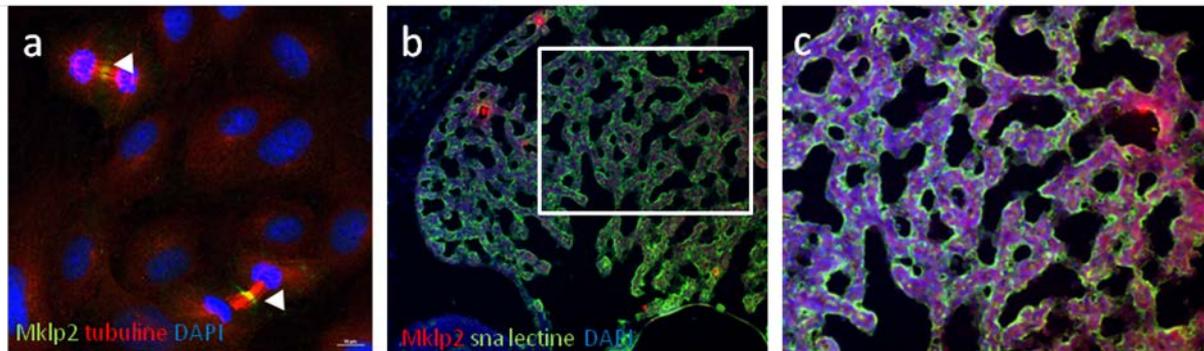


Figure 50: Expression de MKLP-2 dans les tissus vascularisés. La kinésine est marquée en vert, la tubuline est marquée en rouge et les noyaux en bleu, la barre de calibration indique 10 μ m (a). Immuno-marquage de MKLP-2 en rouge dans la vésicule allantoïdienne de poulet. Les vaisseaux sont marqués en vert (b). Agrandissement de la Figure b (c).

Dans des tissus humains tels que le cœur, le placenta, l'endomètre et la muqueuse orale, MKLP-2 est fortement exprimée au niveau des capillaires (Annexe 1 figure S3a-d). Dans les GBM humains, une expression diffuse de MKLP-2 est retrouvée dans toutes les cellules, mais certains capillaires expriment fortement cette kinésine (Annexe 1 figure S3e-f). Cette localisation vasculaire est aussi retrouvée pour l'ARNm de KIF20A et est comparable à celle de PECAM1 dans les GBM humains (Annexe 1 figure S3g-h). Les analyses d'expression d'ARNm issus de la banque de données Oncomine, indiquent la surexpression de KIF20A d'un facteur 18,6 dans le glioblastome comparé au cerveau sain humain (Annexe 1 figure S2b).

L'expression de MKLP-2 dans les différents tissus suggère un rôle de cette kinésine au sein du réseau vasculaire.

Des données obtenues avec le projet bioGPS montrent une forte corrélation dans les niveaux de transcrits de KIF11 et KIF20A dans 84 tissus et lignées cellulaires analysées. Une forte expression de KIF11 et KIF20A est observée dans des cellules de lymphomes malins ainsi que dans les cellules endothéliales CD105+ et CD34+.

Des analyses Oncomine montrent une co-régulation des kinésines mitotiques induites par le VEGF (KIF11, KIF20A, KIF4A, KIF23 et KIF15) ainsi qu'avec d'autres kinésines (KIF18B et KIF14) dans les tumeurs du cerveau (*Annexe 1 figure S4*).

2) L'inhibition chimique des kinésines réduit l'angiogenèse *in vitro*

Les expériences fonctionnelles ont été réalisées sur Eg5 et MKLP-2 pour lesquels nous disposons d'inhibiteurs.

2.1) L'inhibition chimique des kinésines bloque la prolifération et induit l'apoptose.

Les inhibiteurs d'Eg5 utilisés au cours de cette thèse, le DMN, l'ispinesib et le SB-743921 sont connus pour leur effet anti-prolifératif dans les cellules tumorales.

Nous les avons testés dans deux types cellulaires endothéliaux humains (HUVEC et hCMECd/3) (*figure 51f et g*) comparé à des cellules de glioblastomes humains (SF126, SF188, U87, T98G) et murins GL261 (*figure 51a-e*). L'inhibition d'Eg5 par le DMN inhibe la prolifération des cellules endothéliales humaines (HUVEC et Hcmecd/3) et celle des glioblastomes humains (SF126, SF188, T98G et U87) et murins (GL261). La prolifération des ABAE induite par le VEGF ou le FGF est inhibée totalement par le DMN (*figure 51h*). La prolifération des autres cellules étant stimulée par le sérum, l'inhibition de celles-ci via la DMN semble donc indépendante de la stimulation. Les cellules tumorales ont une prolifération plus rapide que les cellules endothéliales pourtant leur sensibilité semble équivalente.

Le DMN a aussi été testé dans des lignées de neuroblastomes (CHP134, GIMEN, Kelly, IMR5 et SHEP) dans lesquelles il inhibe la prolifération à des doses de 0,5 μ M et 1 μ M (*Annexe 1 figure 3g*).

Par la suite, les deux autres inhibiteurs d'Eg5 (l'ispinesib et le SB-743921) ont été testés en prolifération, d'autant plus qu'ils possèdent une plus forte affinité pour la kinésine que le DMN. Ces inhibiteurs sont donc utilisés à des doses moindres et diminuent significativement la prolifération des Renca à partir de 5nM pour l'ispinesib et 1nM pour le SB-743921 (*figure 51i*).

Ces résultats corrént avec une étude qui a montré l'effet antiprolifératif des inhibiteurs d'Eg5 sur les cellules U87 (Valensin et al., 2009).

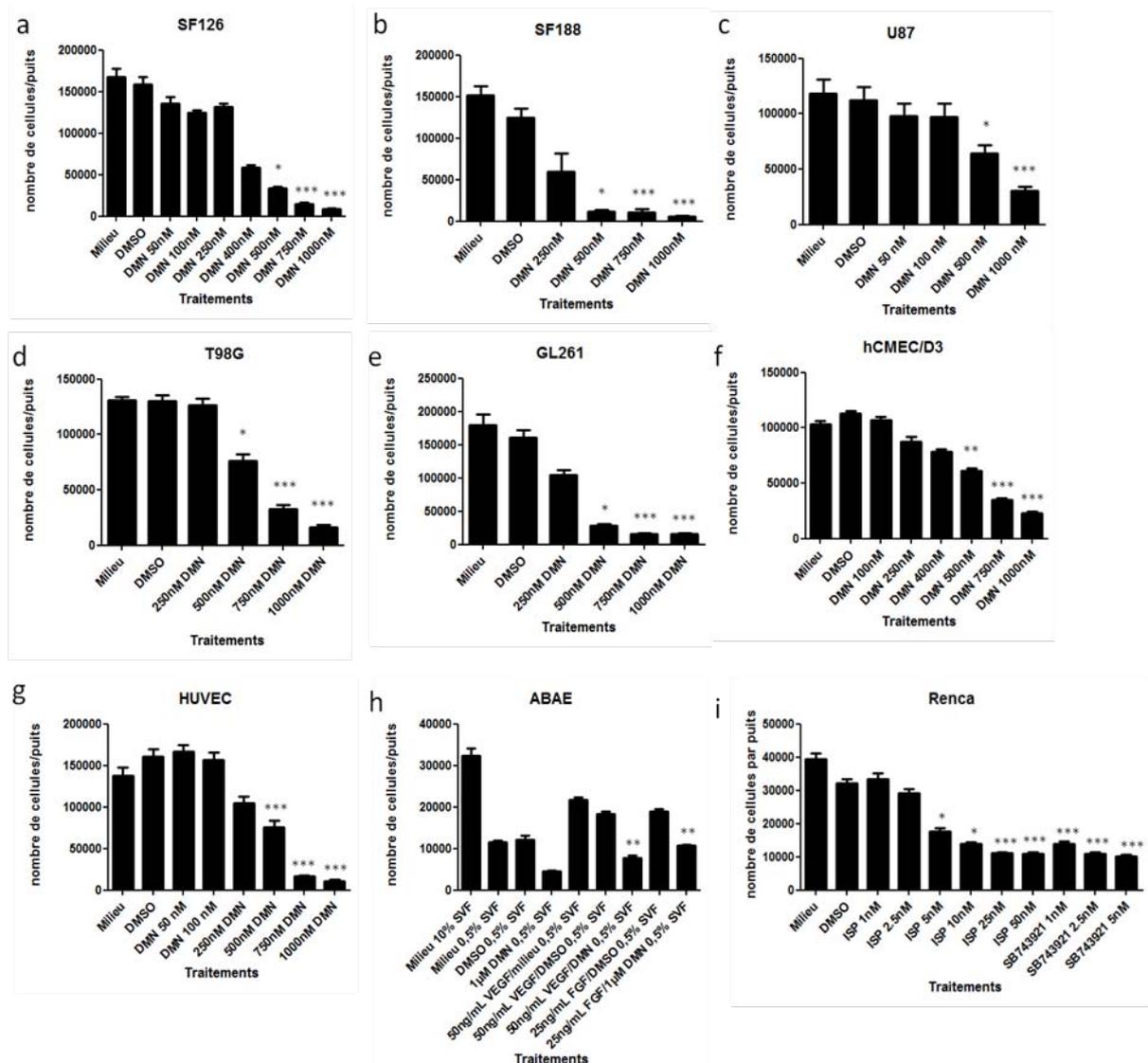


Figure 51: L'inhibition d'Eg5 réduit la prolifération des cellules endothéliales et tumorales. Le nombre total de cellules par puits est comptabilisé pour chaque condition après 72h de prolifération des SF126 (a), SF188 (b), des U87 (c), des T98G (d), des GL261 (e), des hCMECD/3 (f), HUVEC (g), ABAE (h) et Renca (i). La stimulation des ABAE a été réalisée avec le VEGF (10ng/mL) et le FGF-2 (25ng/mL).

L'inhibiteur de MKLP-2, le paprotrain a été testé sur la prolifération des cellules tumorales U87 et Renca et des cellules endothéliales HUVEC. Il inhibe significativement la prolifération des HUVEC à partir d'une dose de 10µM et celle des Renca et des U87 à une dose de 20µM (figure 52). Cette inhibition est faible puisqu'elle est de l'ordre de 34% pour les Renca et de 23% pour les U87 (figure 52 a et b). En comparaison, l'inhibition de la

prolifération des U87 avec le DMN est de l'ordre de 75% (*figure 51c*). La prolifération des cellules HUVEC est inhibée à 70% pour une dose de 20 μ M de paprotrain ce qui suggère qu'elles sont plus sensibles au traitement que les cellules tumorales testées (*figure 52c*).

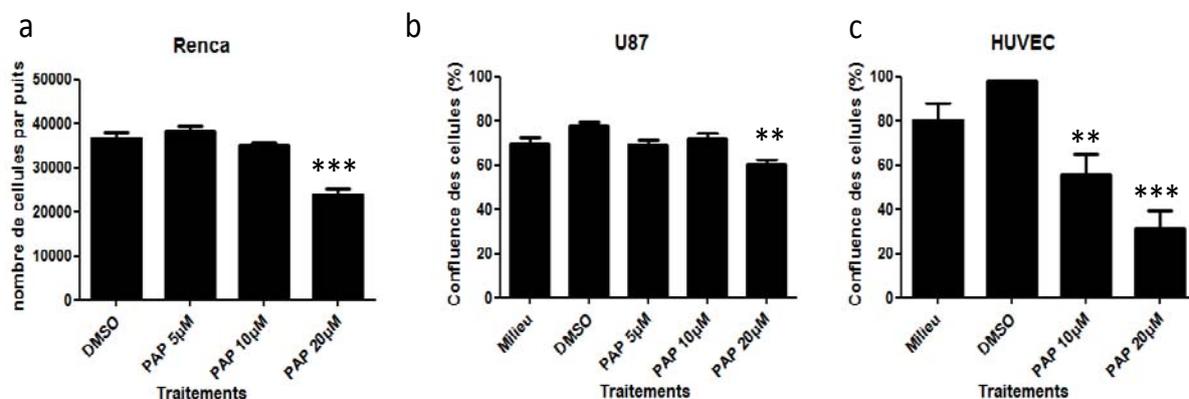


Figure 52 : L'inhibition de MKLP-2 par le paprotrain réduit la prolifération des Renca et des HUVEC. Les Renca sont comptées (a) et la confluence des cellules U87 et HUVEC est enregistrée par l'Incucyte (b et c) après 72h de prolifération.

Afin de comprendre si la réduction du nombre de cellules avec les traitements anti-kinésines est due à un blocage de la mitose ou à une induction d'apoptose, des immuno-marquages, des expériences de cytométrie de flux, ainsi que des tests d'apoptose ont été réalisés.

Il a été montré que le traitement de cellules U87 avec des inhibiteurs d'Eg5 tels que l'ispinesib, bloque 61% des cellules en phase G2 ou en mitose (G2/M) comparé à 46% dans les cellules non traitées (Valensin et al., 2009). Nous avons utilisé les U87 comme contrôle, pour vérifier que la réduction du nombre de cellules HUVEC traitées avec le DMN est due à un blocage en mitose de ces cellules.

Dans notre étude nous avons eu recours au marquage du noyau par le DAPI pour la différenciation des phases du cycle cellulaire. Celui-ci est divisé en 4 phases principales : G1 (avant répllication ADN), S (répllication du matériel génétique) phase G2/M (division cellulaire).

Dans les HUVEC et les U87 en contrôle, il y a une majorité de cellules en phase G0/G1, respectivement 62% et 57.3%. Les autres cellules sont réparties entre la phase de synthèse (3,7% pour les HUVEC et 11% pour les U87) et la phase G2/M (34% pour les HUVEC et 28.7% pour les U87) (*figure 53a et b*). Le traitement au DMN entraîne une augmentation du

nombre de cellules en phase G2/M soit 45,3% pour les HUVEC et 64,5% pour les U87. Ces cellules sont bloquées en mitose d'où la réduction du nombre de cellules après un traitement au DMN (*figure 51c et g*).

Les immuno-marquages des noyaux et des microtubules révèlent un phénotype particulier des cellules traitées par les inhibiteurs d'Eg5 après 24h de traitement: Les microtubules sont organisés en un unique astre appelé mono-astre (*figure 53f et g*) contrairement au fuseau bipolaire normalement observé en condition témoin (*figure 53e*). Privée de fuseau bipolaire, les chromosomes ne peuvent pas migrer aux pôles de la cellule et être répartis équitablement dans les deux futures cellules filles. Ces mono-astres correspondent à ceux précédemment décrits avec d'autres inhibiteurs d'Eg5 tels que le DMN ou avec les siARN (Zhu et al., 2005 ; Mayer et al., 1999).

Après un traitement de 72h avec l'ispinesib 5nM ou le SB 1nM, les cellules bloquées en mitose avec un mono-astre de tubuline ne sont plus observées (*figure 53i et j*). Les cellules sont étalées, néanmoins celles-ci présentent des anomalies nucléaires. Les noyaux sont restés dans leur configuration en anneau induite par le mono-astre de tubuline. Pourtant le cytosquelette de tubuline est comparable à celui observé dans les cellules en interphase en condition témoin (*figure 53h*). Il est possible que ces cellules aient réalisé une sortie anormale de la mitose puis se soient à nouveau étalées. Le devenir de ces cellules n'a pas été étudié, mais de part leur anomalie nucléaire, il est très probable qu'elles soient incapables de réaliser une nouvelle mitose. Dans ce cas, elles déclencheraient l'apoptose.

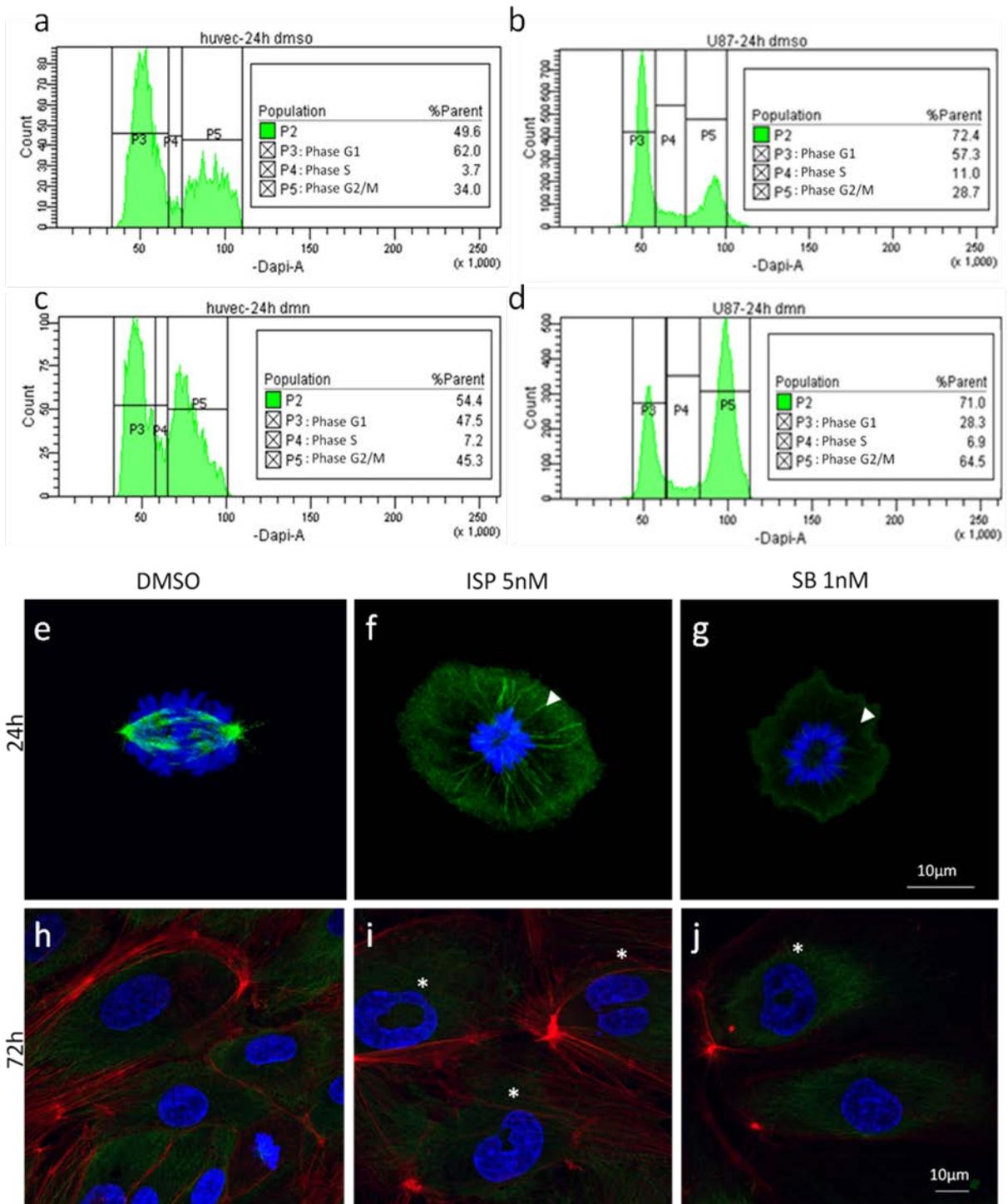


Figure 53: L'inhibition d'Eg5 bloque la mitose et induit la formation de mono-astres. Expériences de cytométrie de flux réalisées sur des HUVEC (a,c) et des U87 (b,d) contrôles (a,b) ou traitées 24h au DMN (c,d). Les graphes représentent la répartition de la population P2 au cours du cycle cellulaire. P2 représente la population analysée soit environ 71% des cellules totales. La population P3 représente les cellules en G0/G1, la P4 les cellules en phase de synthèse et la P5 en phase G2/M (a-d). Traitement des cellules HUVEC pendant 24h (e-g) ou 72h (h-j). Fuseau bipolaire en contrôle (e). Les noyaux sont marqués en bleu par un marquage DAPI, les microtubules en vert et l'actine en rouge. Les flèches indiquent les astres de tubuline (f,g) et les étoiles indiquent les noyaux anormaux (i,j).

Dans la plupart des cas, l'arrêt mitotique induit l'apoptose à travers la dépolymérisation de la membrane des mitochondries et l'activation de la caspase 3. Comme les inhibiteurs des kinésines sont connus pour induire l'apoptose dans une variété de cellules tumorales (Vijapurkar et al., 2007, Valensin et al., 2009 ; Tcherniuk et al., 2010), ils ont donc été évalués dans un test d'apoptose sur les cellules HUVEC. Afin d'identifier les cellules HUVEC en apoptose, un substrat de la caspase 3/7 couplé à l'Alexa 488nm est ajouté aux traitements des cellules. Le substrat initialement inerte et non fluorescent passe à travers la membrane cellulaire. Il est ensuite clivé dans la cellule par les caspases 3/7 activées libérant alors une fluorescence verte. Les cellules apoptotiques qui fluorescent dans le vert versus les cellules totales sont comptabilisées à un temps court (24h) afin de s'affranchir de l'apoptose induite par la forte confluence cellulaire (figure 54a).

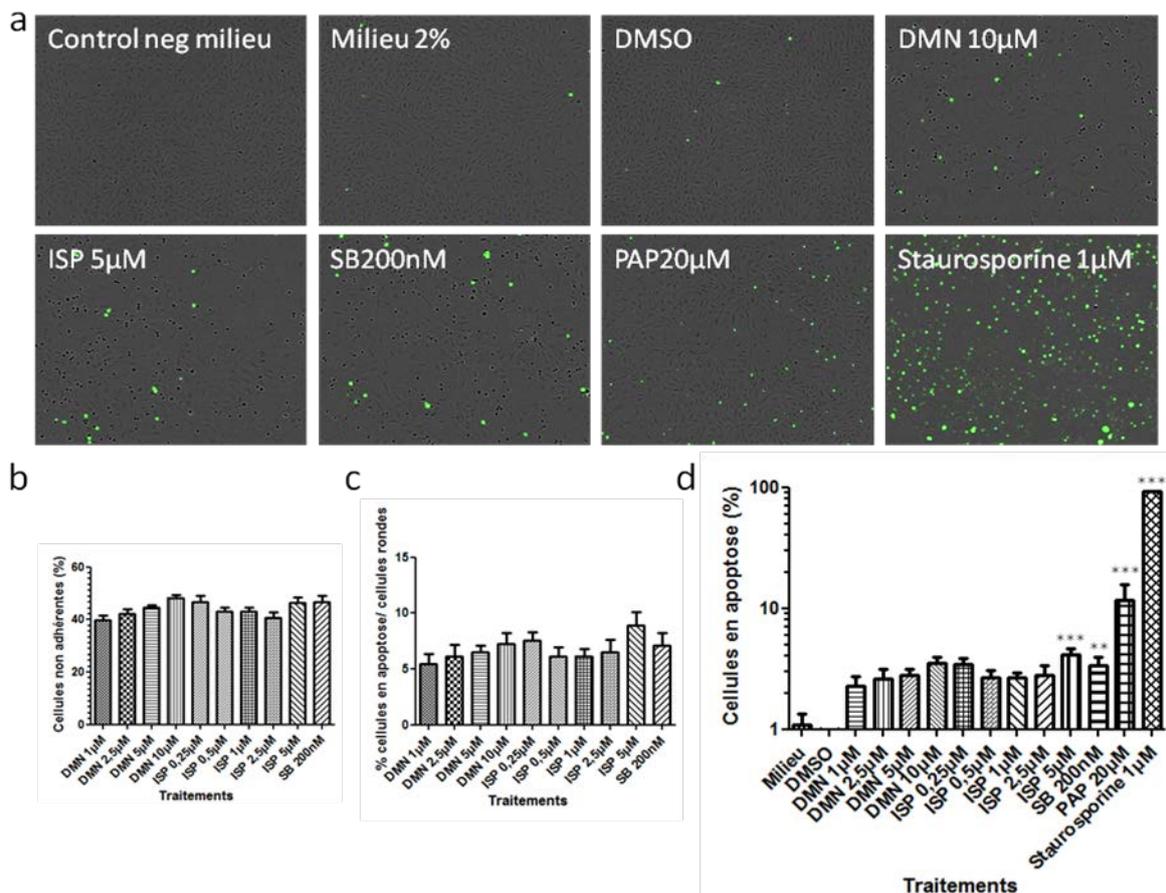


Figure 54 : Inhibition de MKLP-2 et Eg5 induit l'apoptose des HUVEC. Traitement des cellules HUVEC pendant 24h ou 72h. Photographies des cellules en contraste de phase. Les cellules apoptotiques fluorescent dans le vert (a). Pourcentage des cellules non adhérentes dans les traitements anti-Eg5 (b). Pourcentage des cellules en apoptose dans les cellules en apoptose (c). Cellules en apoptose dans les différentes conditions (d).

L'inhibiteur de protéine kinase, la staurosporine est connue pour induire l'apoptose dans les cellules et correspond au contrôle positif (Falcieri et al., 1993). Plus de 92% des HUVEC traitées à la staurosporine sont en apoptose (*figure 54d*).

Dans les cellules HUVEC traitées avec les inhibiteurs d'Eg5, 40% des cellules ne sont pas adhérentes. Ces cellules correspondraient aux cellules bloquées en phase G2/M (*figure 53c*) et environ 5 à 10% d'entre elles ne se ré-étaient pas et déclenchent directement le processus d'apoptose (*figure 54b et c*).

L'induction de l'apoptose est significative pour les plus fortes doses d'inhibiteurs (DMN 10 μ M, ispinesib 5 μ M, SB200nM et paprotrain 20 μ M) (*figure 54d*). L'induction de l'apoptose dans les cellules traitées avec le paprotrain, pourrait être du à une cytokinèse anormale associée à la formation de cellules multinuclées comme décrit pour les cellules Hela (Tcherniuk et al., 2010). Cependant des études suggèrent que l'effet de l'inhibition de MKLP-2 sur la survie cellulaire ferait intervenir un autre mécanisme, indépendant de la cytokinèse. Ceci a été mis en évidence par l'utilisation d'un ARNi ciblant KIF20A dans les cellules MCF7, dans lesquelles a été observé une mort lysosomale (Groth-Pedersen et al., 2012).

En conclusion, la diminution du nombre de cellules dans les puits traitées avec les inhibiteurs d'Eg5 est la conséquence du blocage de la mitose, associée à l'induction de l'apoptose. La source de l'induction de l'apoptose par le paprotrain dans les HUVEC reste à définir.

Afin de mettre en évidence le rôle des kinésines dans l'angiogenèse, les inhibiteurs d'Eg5 et MKLP-2 ont été utilisés dans des tests d'angiogenèse *in vitro* tels la tubulogenèse, la migration et l'adhérence cellulaire.

2.2) Le blocage chimique d'Eg5 et MKLP-2 inhibe l'angiogenèse *in vitro*.

- La formation de tubes

L'inhibition d'Eg5 et de MKLP-2 a été testée dans un phénomène indépendant de la mitose, la formation de tubes *in vitro* ou tubulogenèse.

Dans les conditions contrôle (Milieu 1% SVF et DMSO 0.2%), le réseau de tubules est correct avec de multiples embranchements et de longs tubes (*figure 5b et c*). Le rôle dans l'angiogenèse d'un agent chimique l'indirubin-3'-monoxyde (IRO) a été démontré chez le poisson zèbre et dans le traitement et dans les HUVECs (Kim et al., 2011; Tran et al., 2007). Cet agent utilisé en médecine chinoise dans le traitement de la leucémie sert de contrôle

positif dans les tests de tubulogenèse. L'effet de cet agent est visible sur la formation des tubes, mais n'est pas significatif. Dans les puits où Eg5 et MKLP-2 ont été inhibées, il y a plus de tubes indépendants, les réseaux fermés sont donc moins nombreux, il y a moins de tubes au total et moins de points d'embranchement (*figure d-e*). Ces critères ont été quantifiés de manière automatisée (*figure f-i*).

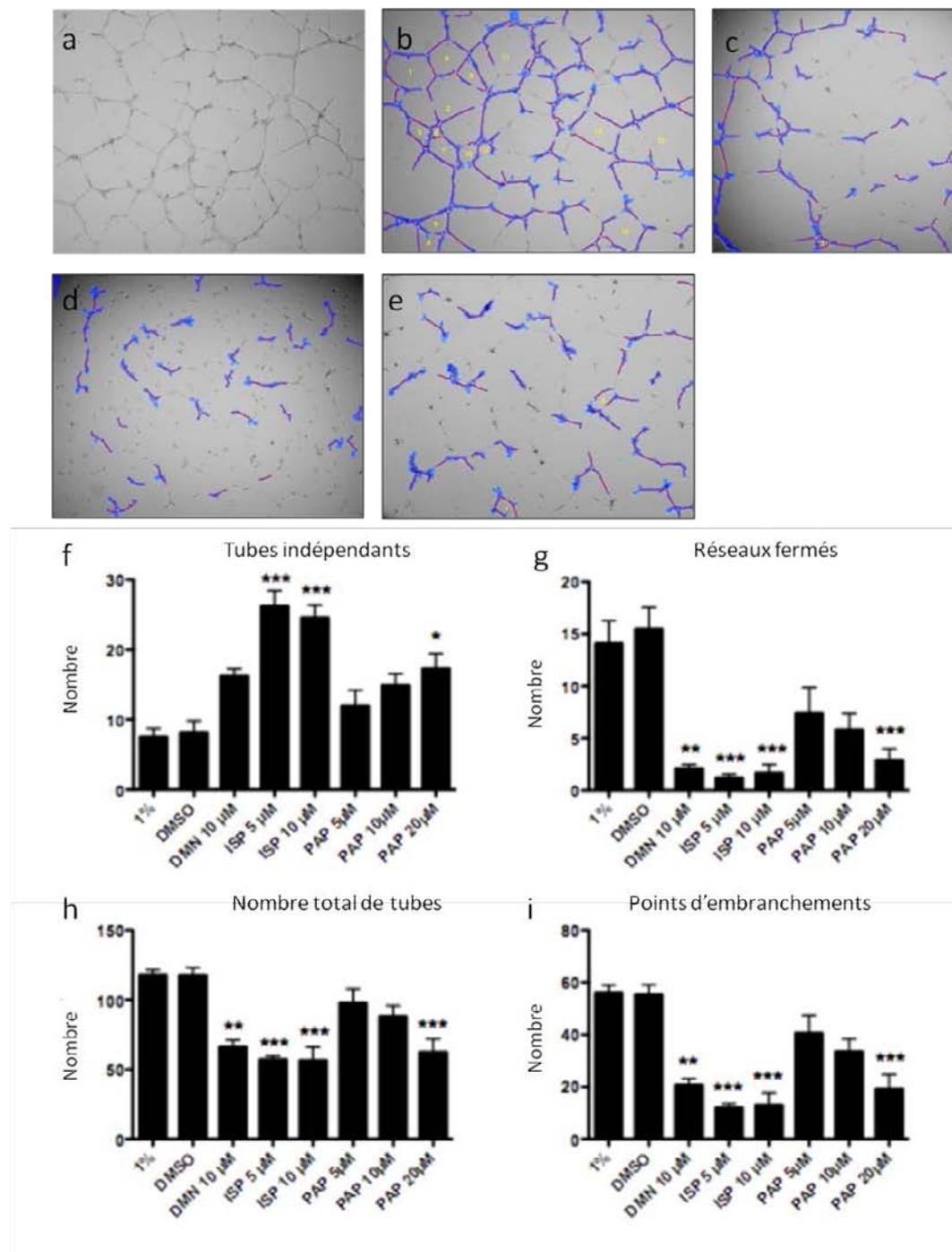


Figure 55 : L'inhibition d'Eg5 et MKLP-2 réduit la tubulogenèse dans les HUVEC. Photographie en contraste de phase de la condition DMSO (a). Masque de quantification pour la condition DMSO (b) DMN 10µM (c), ISP 5µM (d) et PAP20µM (e). Les quantifications du nombre de tubes indépendants (f), de réseaux fermés (g), des tubes au total (h) et des points d'embranchements (i) sont réalisées par Wimasis, une plateforme d'analyse d'image.

La tubulogenèse a été décrite comme se déroulant en absence de mitose (Arnaoutova et al., 2009), ce qui a été contrôlé dans nos conditions de test en ajoutant du BrdU (intercalant de l'ADN qui s'incorpore dans les cellules nouvellement générées) aux traitements des HUVEC avant l'ensemencement. Une partie du réseau est visible grâce aux noyaux marqués par le DAPI.

Parmi tous les puits étudiés, seules deux cellules sont marquées au BrDU, soient deux nouvellement générées ont été observées. Il est possible que ces cellules aient commencé leur mitose avant d'être ensemencées dans la plaque 15 puits et qu'elles se soient étalées.



Figure 56: Immunofluorescence BrDU sur cellules en tubulogenèse. Le BrDU en vert marque les cellules nouvellement générées et le DAPI marque les noyaux.

La tubulogenèse réplique des étapes essentielles à la formation d'un vaisseau incluant l'adhérence, la migration, la sécrétion de protéases et la formation de tubes. Afin de déterminer, à quel niveau les kinésines contribuent à la formation des vaisseaux, les inhibiteurs ont été testés sur l'adhérence des HUVEC à des matrices et leur migration.

- L'adhérence

Afin de tester les effets des traitements anti-kinésine sur l'adhérence des cellules, celles-ci sont prétraitées durant 15h avec des inhibiteurs d'Eg5 et de MKLP-2 puis sont ensemencées sur différentes matrices. L'adhérence est observée à 30min et 1h. Les cellules traitées à l'ispinesib adhèrent moins et s'étalent significativement plus lentement que les cellules témoins (*figure 57a et c*). Ce phénomène qui est indépendant de la matrice utilisée serait lié à un défaut de polymérisation de l'actine dans la condition avec l'ispinesib (*figure 57b*).

Le paprotrain n'inhibe pas l'adhérence des HUVEC à la matrice. Son rôle dans l'inhibition de la tubulogenèse passerait donc par un autre mécanisme.

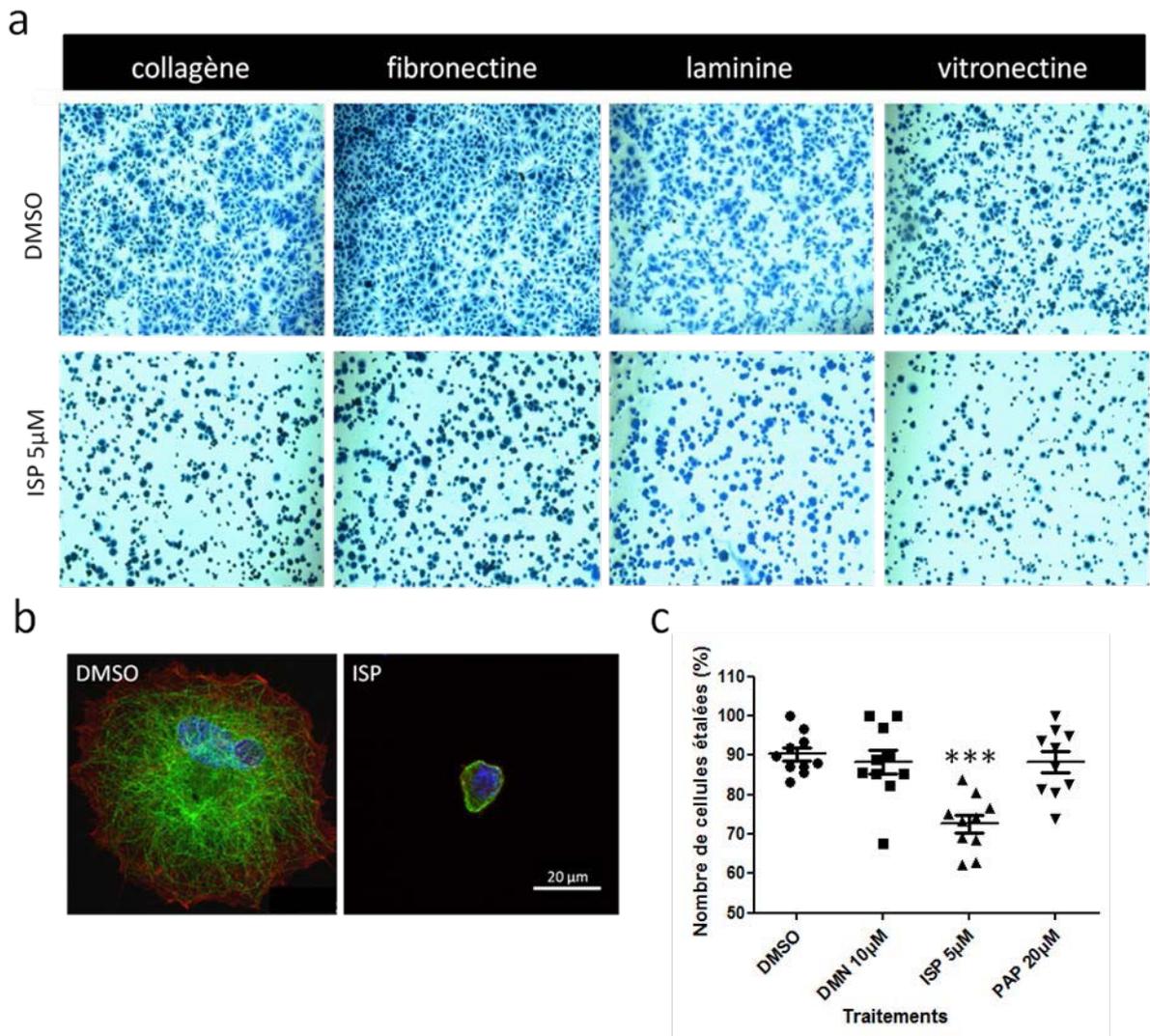


Figure 57 : L'inhibition chimique d'Eg5 réduit l'adhérence des HUVEC sur les matrices. Les cellules sont prétraitées pendant 14h30 au DMSO ou à l'ispinesib 5µM puis ensemencées sur diverses matrices : collagène (100µg/mL), fibronectine (5µg/mL), laminine (5µg/mL) and vitronectine (0,5µg/mL). Les cellules adhérentes sont marquées au bleu de méthylène (b). Immuno-marquage du cytosquelette d'actine et de tubuline dans des HUVEC qui adhèrent sur une matrice de collagène (c).

- La migration

Une étude suggère que le DMN inhibe la migration et l'invasion de cellules tumorales pancréatiques, les PANC-1, indépendamment de son effet anti-prolifératif (Sun et al., 2011). Nous avons donc testé le rôle de cette kinésine dans la migration de cellules endothéliales, les HUVEC. Eg5 est fortement exprimée au niveau des cellules HUVEC qui s'allongent pour migrer dans la cicatrice (*figure 58a*). Ces cellules qui ne sont pas mitotiques ont été quantifiées aux abords de la cicatrice et dans deux champs plus éloignés. Il en ressort qu'il y a significativement plus de cellules qui expriment fortement Eg5 à proximité de la cicatrice comparées à des cellules dans des zones plus éloignées (*figure 58b*). Ceci suggère que la

kinésine Eg5 pourrait être impliquée dans la migration des cellules endothéliales HUVEC. Ainsi, les inhibiteurs d'Eg5 et de MKLP-2 ont été testés sur la migration des HUVEC. Les migrations des cellules contrôles (*figure 58c*) ou traitées avec l'ispinesib (*figure 58d*) ou avec le paprotrain (*figure 58e*) ont été photographiées et quantifiées par l'Incucyte. L'ispinesib et le paprotrain ont diminué significativement la migration des cellules HUVEC (*figure 58f et g*).

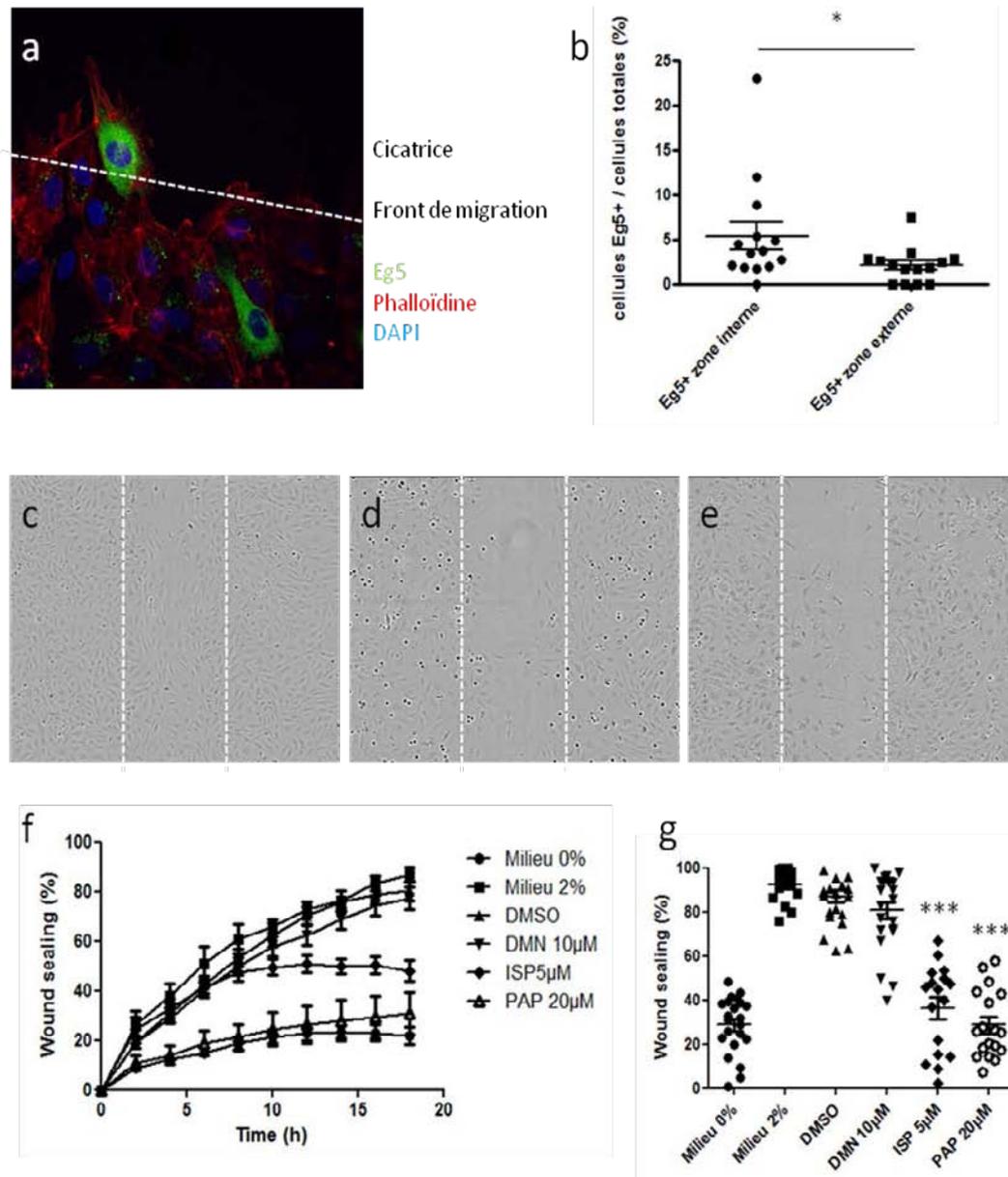


Figure 58 : Rôle d'Eg5 dans la migration des cellules HUVEC. Immuno-marquage d'Eg5 dans les cellules HUVEC (a). Quantification des HUVEC qui expriment fortement Eg5 (cellules Eg5+) en périphérie de la cicatrice (zone interne) et éloignée de la cicatrice (zone externe) (b). Photographies en contraste de phase, prises au temps 18h, des migrations HUVEC témoins (c), prétraitées à l'ispinesib (d) ou au paprotrain (e). Représentation graphique de la migration HUVEC avec les différents traitements (f). Les quantifications sont réalisées pour le temps 18h (g).

Nous avons montré que l'inhibition de la kinésine Eg5 réduit l'adhérence et la migration cellulaire et que l'inhibition de MKLP-2 bloque la migration des cellules endothéliales

HUVEC. Afin de déterminer si ces effets sont retrouvés *ex vivo*, les inhibiteurs ont été testés dans des cultures d'anneaux aortiques de souris.

2.3) L'inhibition chimique des kinésines Eg5 par l'ispinesib et le paprotrain réduit la formation de néovaisseaux dans des cultures d'anneaux aortiques.

La migration des cellules en dehors des anneaux commence après 72h de culture au bout desquels les cultures des anneaux aortiques sont traitées avec le contrôle DMSO ou différentes doses d'ispinesib. Au temps 120h, le milieu est changé afin d'apporter des nutriments aux cultures d'anneaux, mais le traitement est maintenu. La migration des cellules en dehors de l'anneau, est inhibée par le traitement ispinesib à partir d'une dose de 50nM. La diminution de l'aire des bourgeonnements observée avec la condition ispinesib à une dose de 10nM, n'est pas significative (*figure 59c*).

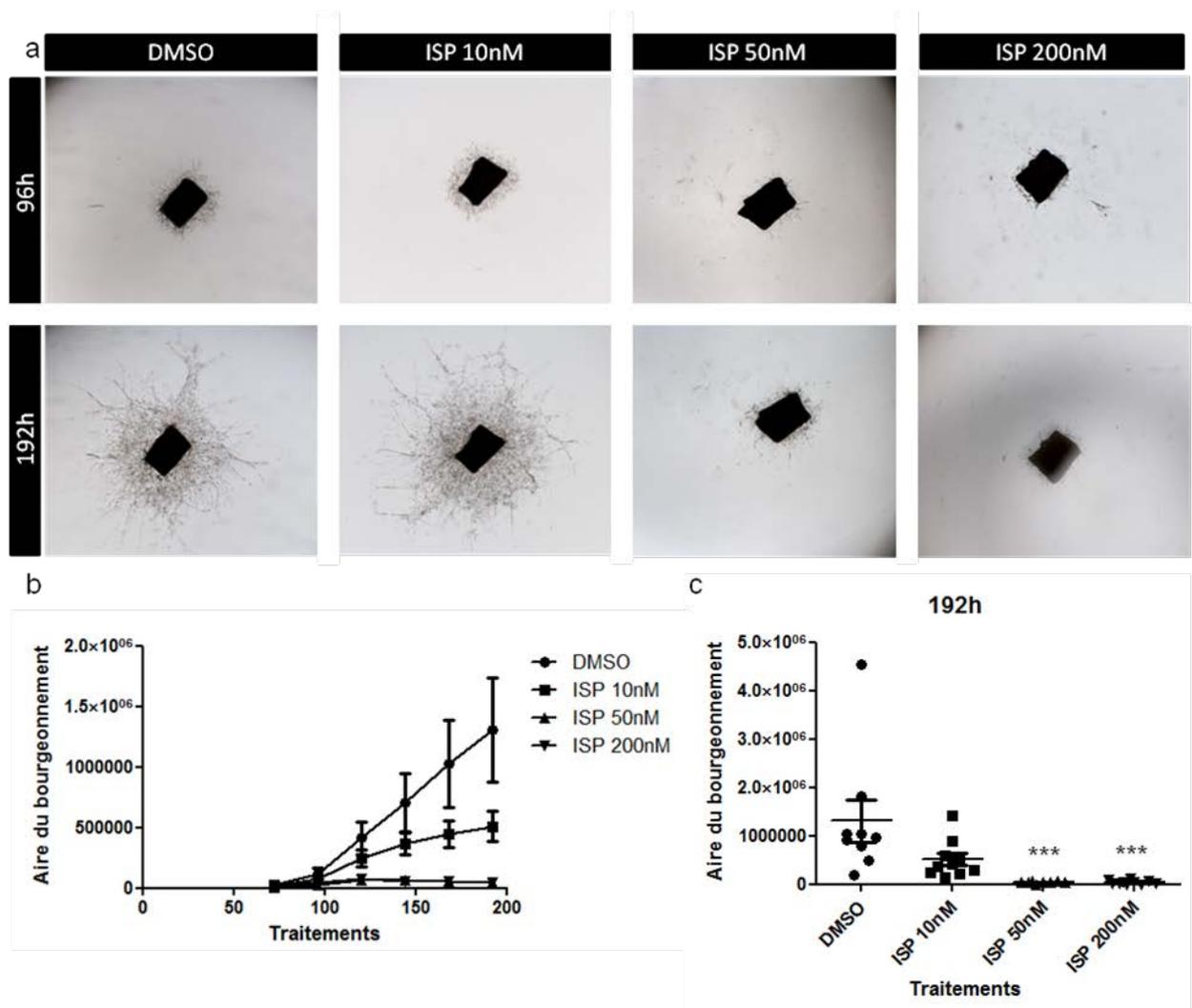


Figure 59: L'ispinesib inhibe les bourgeonnements émanant des anneaux aortiques. Les anneaux sont photographiés à toutes les 24h au macroscopie (a). La quantification a été réalisée sur 9-10 anneaux issus de 4 souris différentes (b et c).

L'inhibition de MKLP-2 a été testée sur les cultures d'anneaux aortiques. Le traitement au paprotrain entraîne une modification des cellules en migration. Elles deviennent arrondies et ne migrent plus. Il est possible que ce phénotype qui n'a pas été observé *in vitro*, soit dû au fait que les cellules sont entrées en apoptose. A partir de 144h, l'aire de la pousse est significativement plus faible dans la condition paprotrain.

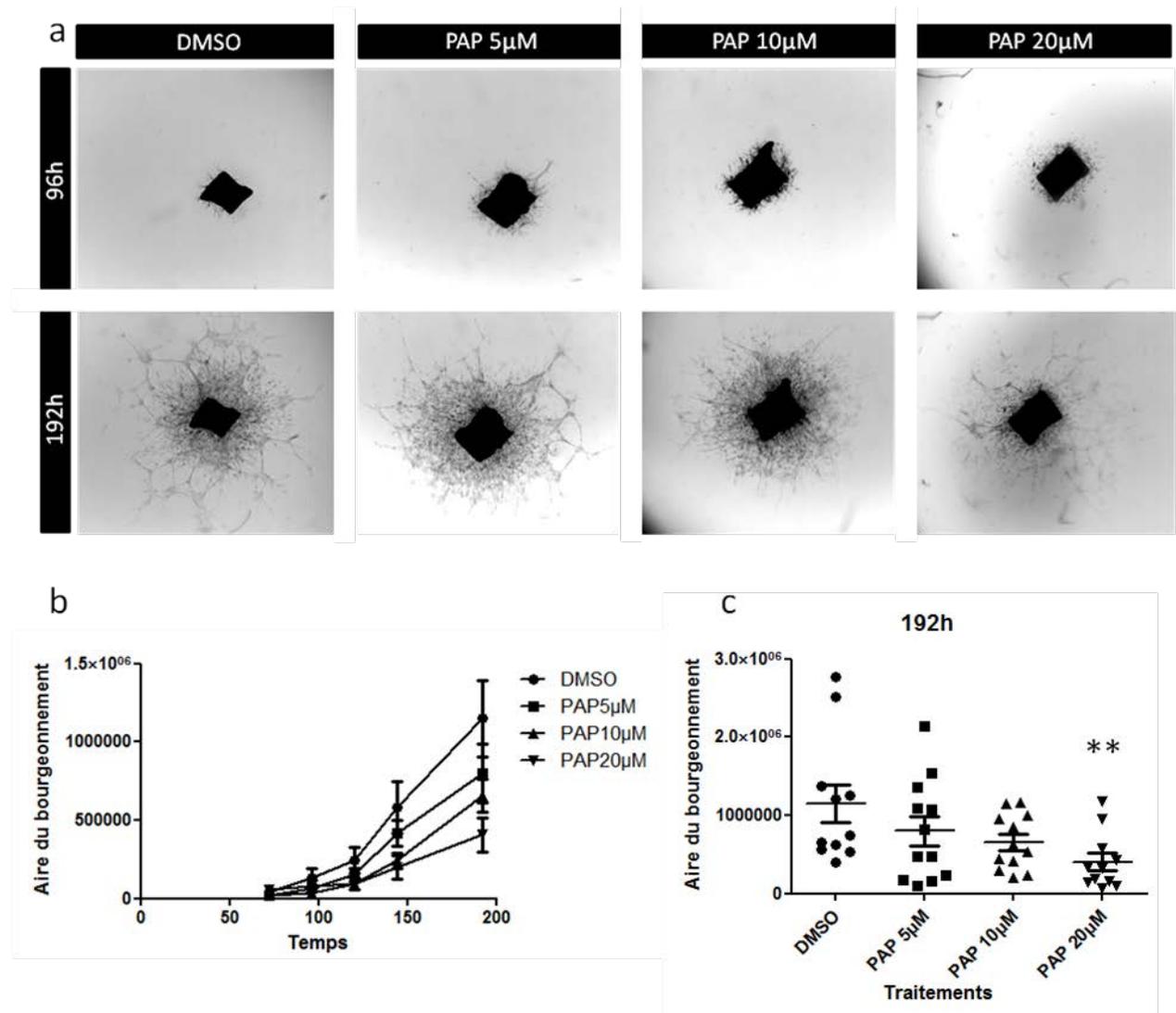


Figure 60 : Le paprotrain inhibe les bourgeonnements émanant des anneaux aortiques. Les anneaux sont photographiés à différents temps avec le microscope (a). La quantification a été réalisée sur 10-12 anneaux issus de 4 souris différentes (b et c). Le traitement au paprotrain a duré 24h (entre 72h et 96h), puis le milieu a été remplacé tous les deux jours.

Ces résultats montrent un rôle d'Eg5 et MKLP-2 dans l'angiogenèse *ex vivo*.

Afin de vérifier la nature de ces cellules migrantes affectées par l'ispinesib ou le paprotrain, un immuno-marquage des cellules endothéliales (CD31) et des cellules murales (NG2) devra être réalisé sur les anneaux aortiques en culture.

Les kinésines Eg5 et MKLP-2 contribuent au processus d'angiogenèse dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*. Sachant que beaucoup de facteurs sont communs à l'angiogenèse physiologique et tumorale, il est possible que ces kinésines soient aussi impliquées dans les deux processus.

II. Rôle de la kinésine Eg5 dans l'angiogenèse tumorale

Dans le contexte de l'angiogenèse tumorale, nous nous sommes focalisés sur la kinésine Eg5 pour laquelle nous disposons d'inhibiteurs puissants. Nous nous sommes d'abord intéressés au glioblastome, car les analyses des niveaux de transcrits issues de la banque de données Oncomine indiquent la surexpression d'Eg5 d'un facteur 3 dans le glioblastome comparée au cerveau sain humain (*Annexe figure S2b*).

1) Le glioblastome

1.1) L'inhibition chimique d'Eg5 par le DMN et l'ispinesib réduit la vascularisation du glioblastome expérimental.

Afin de tester les effets du traitement anti-Eg5 dans un modèle de GBM *in vivo*, les cellules de GBM humain, les U87 sont déposées sur une CAM de poulet. La croissance tumorale est rapide et dès le lendemain, les tumeurs qui se sont développées sont traitées avec les inhibiteurs d'Eg5 ou le solvant (DMSO) pendant 3 jours. Les tumeurs témoins sont rosées (*figure 61a*) alors que les tumeurs traitées avec une ou deux doses de DMN ou d'ispinesib présentent des zones blanches considérées comme avasculaires voire nécrotiques (*figure 61b et d*).

Ces observations macroscopiques sont confirmées par des analyses d'immunofluorescence réalisées sur des coupes de tumeurs, dans lesquelles les tumeurs témoins apparaissent très vascularisées et denses (*figure 61e*).

Avec un traitement au DMN par jour, une réduction de la densité vasculaire est visible en périphérie de la tumeur (*figure 61f*). Et avec deux traitements de DMN par jour, la tumeur est beaucoup moins vascularisée et les vaisseaux sont plus petits (*figure 61g*).

Les tumeurs traitées avec l'ispinesib présentent des zones de nécrose avec des vaisseaux très altérés (*figure 61h*).

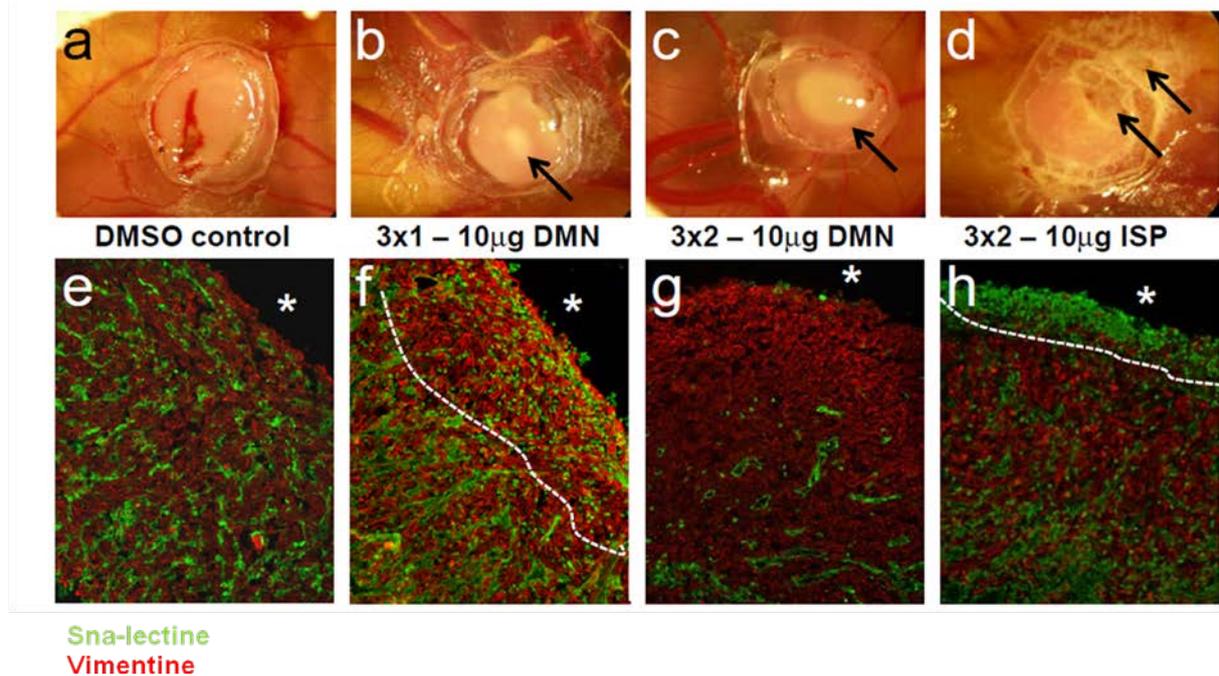


Figure 61: Le DMN et l'ispinesib inhibent l'angiogenèse et la croissance tumorales du glioblastome implanté sur la CAM de poulet. Biomicroscopie des GBM implantés sur la CAM après 4 jours de croissance (a-d). Les flèches noires pointent les zones avasculaires ou nécrotiques. Les marquages permettent d'apprécier la vascularisation des tumeurs grâce à la lectine en vert et la densité des cellules tumorales grâce à la vimentine en rouge (e-h). Les étoiles blanches indiquent la périphérie de la tumeur.

Les biomicroscopies des tumeurs ont été évaluées par plusieurs individus afin de les classer selon leur vascularisation. Les résultats issus de ce test en aveugle sont représentés graphiquement (*figure 62*). Dans les tumeurs qu'ils ont considéré comme étant peu vascularisées (donc avec « + »), il y a une majorité de tumeurs traitées à l'ispinesib alors que dans les tumeurs qu'ils ont considéré comme étant très vascularisées (donc avec « +++ »), il y a une majorité de tumeurs témoins.

Ce test indique qu'il y a significativement moins de vaisseaux dans les tumeurs traitées avec l'ispinesib comparé aux tumeurs témoins.

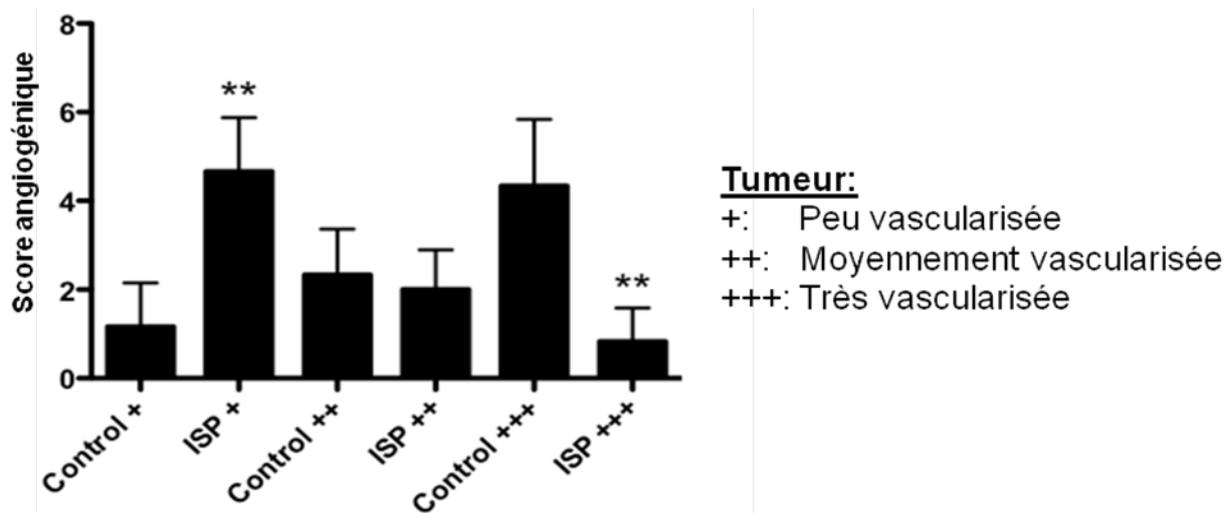


Figure 62: Répartition des tumeurs en fonction de leur vascularisation: Test en aveugle réalisé sur 7 personnes chargées de classer les tumeurs dans trois groupes « peu vascularisée », « moyennement vascularisée » et « très vascularisée ».

L'implantation du GBM sur la CAM est particulièrement utile pour tester rapidement l'effet d'un produit sur le développement tumoral. Mais ce modèle s'affranchit des interactions avec le stroma d'où la nécessité de réaliser une implantation orthotopique chez la souris.

1.2) Effet du traitement ispinesib sur la vascularisation et la croissance des glioblastomes.

Les expériences précédentes réalisées sur la CAM démontrent l'efficacité des traitements anti-Eg5 sur le volume et la vascularisation tumorale. L'ispinesib étant l'inhibiteur le plus affiné pour Eg5, il a donc été testé dans un modèle de xénogreffe de souris. Nous avons utilisé un contrôle positif, l'Avastin. Cet anticorps qui inhibe le VEGF, est connu pour son effet anti-angiogénique dans une gamme de tumeurs incluant le GBM.

Les glioblastomes U87 traités avec le solvant sont très hétérogènes en poids (45 à 240 mg) mais diffèrent peu au niveau de leur vascularisation, puisqu'ils possèdent des vaisseaux apparents et sont bien rosés. Les tumeurs traitées avec l'Avastin et /ou l'ispinesib sont généralement plus pâles et plus petites que les contrôles.

Les tumeurs traitées à l'Avastin seul sont assez homogènes en poids (36 à 100mg) et sont plus petites que les tumeurs contrôles mais le résultat n'est pas significatif possiblement dû à l'hétérogénéité dans le solvant et le faible nombre d'animaux dans la condition Avastin. Ces tumeurs sont multilobées ce qui suggère qu'elles sont plus invasives. En effet bien que l'AVA apporte un bénéfice sur la survie globale, il a été montré dans un modèle de tumeurs U87

implantées chez la souris immuno-déficiente « nude » que cet anticorps induit l'invasion tumorale (de Groot et al., 2010).

Au niveau du poids, les tumeurs ispinesib sont plus hétérogènes que les tumeurs AVA et peuvent être réparties en deux groupes distincts:

- un groupe composé de 8 tumeurs pourraient être sensibles au traitement par l'ispinesib puisqu'elles pèsent moins de 50mg.
- Un groupe composé de 4 tumeurs qui ont poussé malgré le traitement et atteint des poids comparables aux contrôles (supérieurs à 100mg).

Les souris ayant reçu la combinaison ispinesib/Avastin développent des tumeurs significativement plus petites. Le TGI moyen (inhibition de la croissance tumorale) étant de 80% par rapport aux contrôles. Pourtant, nous ne pouvons pas conclure que l'ispinesib a apporté un bénéfice par rapport à l'AVA seul car le nombre d'individus dans cette condition est trop faible (*figure 63*).

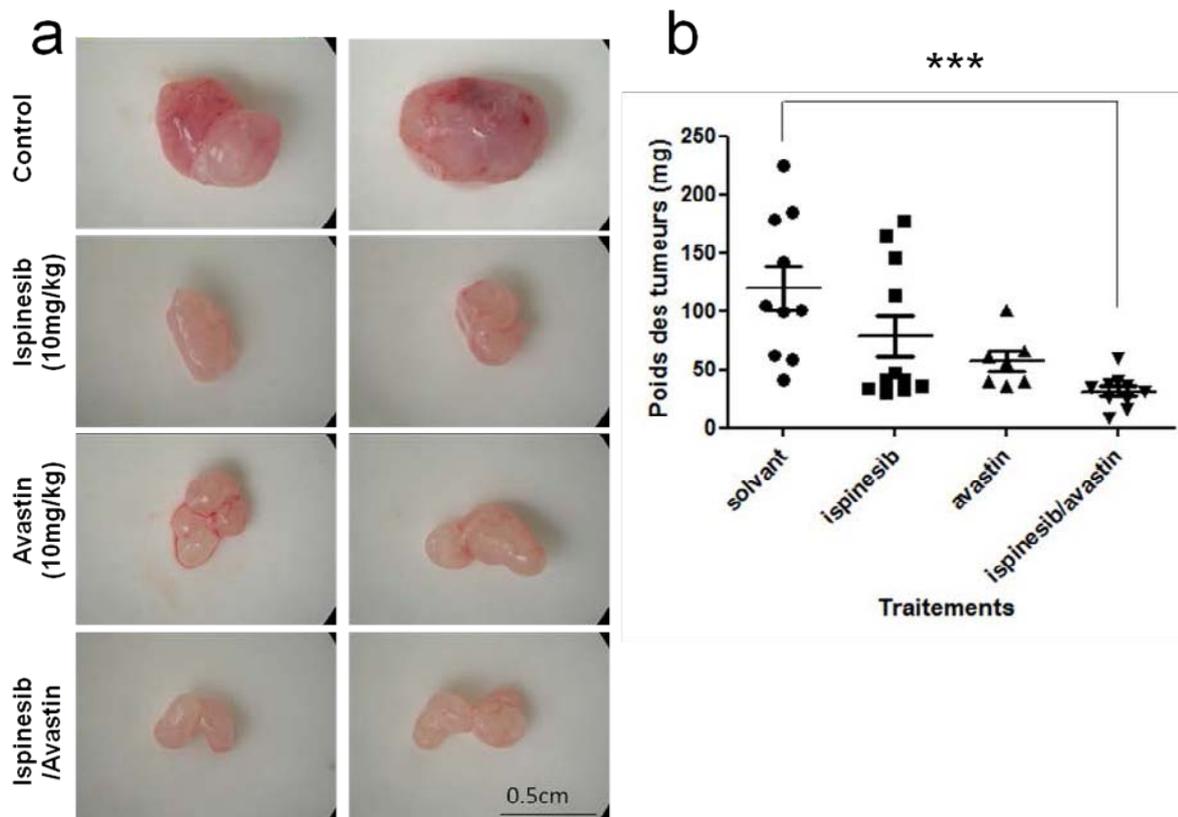


Figure 63: Effet de l'inhibition d'Eg5 sur le glioblastome U87. Les souris sont sacrifiées entre 25 et 28 jours après injection des cellules tumorales. Le traitement à l'ispinesib commence à J3. Les souris sont traitées deux fois par semaine pendant 3 semaines. Les tumeurs sont isolées du cerveau puis photographiées (a). Représentation graphique du poids des tumeurs isolées en fonction des traitements (solvant n=10, ispinesib n=12, avastin n=7 et ispinesib/avastin n=9=) (b).

Le prélèvement des tumeurs apporte une information sur le volume et le poids tumoral, néanmoins il dissimule l'ancrage de la tumeur dans le tissu sain, les interactions ainsi que les débuts d'invasions possibles dans le tissu sain.

La coloration Hématoxyline/Eosine (H&E) permet la coloration des cellules tumorales qui possèdent un grand cytoplasme en bleu-violet.

Les marquages des vaisseaux avec CD31 confirment que les tumeurs contrôles sont plus vascularisées que les tumeurs traitées avec l'Avastin et/ou l'ispinesib. Comme attendu, l'Avastin qui inhibe le VEGF (humain) sécrété par les cellules tumorales, réduit la vascularisation des tumeurs.

Les tumeurs traitées avec la combinaison sont moins denses comparé à celles qui ont reçu un traitement unique (avastin ou ispinesib) ou aux contrôles (*figure 64*).

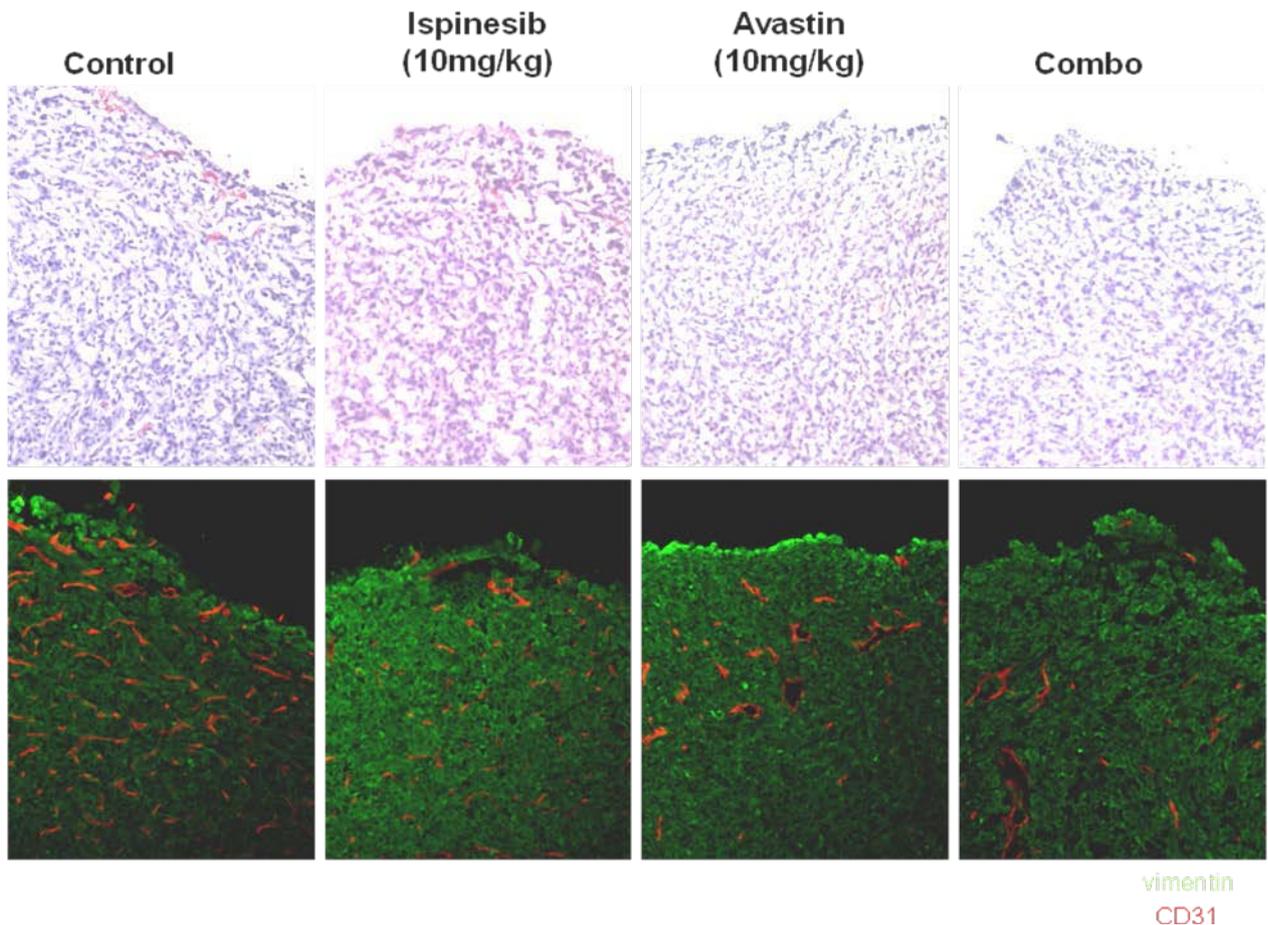


Figure 64 : Effets des traitements avastin, ispinesib ou la combinaison sur la vascularisation des glioblastomes. Les colorations H&E et immunofluorescences sont réalisées sur les tumeurs U87 isolées à partir du cerveau de souris immunodéficientes Rag gamma. Les vaisseaux de souris sont marqués en rouge avec l'anticorps anti-CD31 et les cellules U87 sont marquées avec la vimentine en vert. La barre de calibration indique 20µm.

Le traitement anti-Eg5 avec l'ispinesib seul affecte la vascularisation des GBM U87 implantés chez la souris, mais n'apporte de bénéfice significatif au niveau du volume tumoral. Ce résultat négatif pourrait être dû à la disponibilité de l'inhibiteur pour la tumeur. Celui-ci étant injecté dans le péritoine, il doit passer la BHE pour atteindre la tumeur. D'autre part, l'ispinesib entraîne une neutropénie et les animaux immunodéficients souffrent de ce traitement.

L'utilisation d'un deuxième modèle animal a donc été nécessaire pour tester l'effet du traitement anti-Eg5 dans le cancer.

Ainsi l'expression d'Eg5 a été analysée dans divers cancers humains (RCC) tels que des lymphomes et les carcinomes rénaux à cellules claires. Dans le RCC humain, des marquages ont montré une forte expression vasculaire d'Eg5 (*Annexe 1, figure 2e*) ce qui pourrait suggérer un rôle de la kinésine dans la vascularisation de ce cancer.

2) Le carcinome rénal

2.1) La kinésine Eg5 dans les cellules Renca

Les immunofluorescences sur les cellules Renca montrent que les inhibiteurs d'Eg5 (ispinesib 5nM ou le SB-743921 1nM) entraînent la formation d'un mono-astre de tubuline au bout de 24h de traitement (*figure 65*). Les cytosquelettes de tubuline et d'actine ne semblent pas affectés dans les cellules en interphase. Ainsi la prolifération des cellules est bloquée par l'inhibition d'Eg5, phénomène qui est dose dépendant (*figure 51i*).

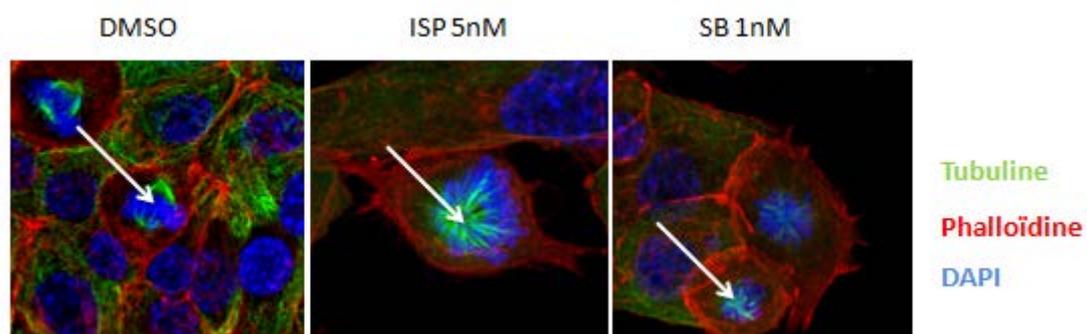


Figure 65 : L'inhibition d'Eg5 par l'ispinesib ou le SB-743921 entraîne la formation d'un mono-astre dans les cellules Renca. Les microtubules sont marquées en vert et la phalloïdine en rouge marque les fibres de stress d'actine. Dans le contrôle (DMSO), un fuseau bipolaire est observé alors que dans les Renca traitées ispinesib ou SB, le fuseau est monopolaire.

2.2) L'ispinesib inhibe la croissance des tumeurs Renca

L'implantation des cellules Renca en sous capsulaire dans le rein de souris Balb/c forme de grosses tumeurs rénales richement vascularisées. Le suivi de la croissance des tumeurs par bioluminescence semble indiquer que la croissance des tumeurs ispinesib est diminuée dès les premiers traitements.

Bien que donnant une tendance réelle de la taille finale des tumeurs, la bioluminescence recueillie est relativement faible (*figure 66*).

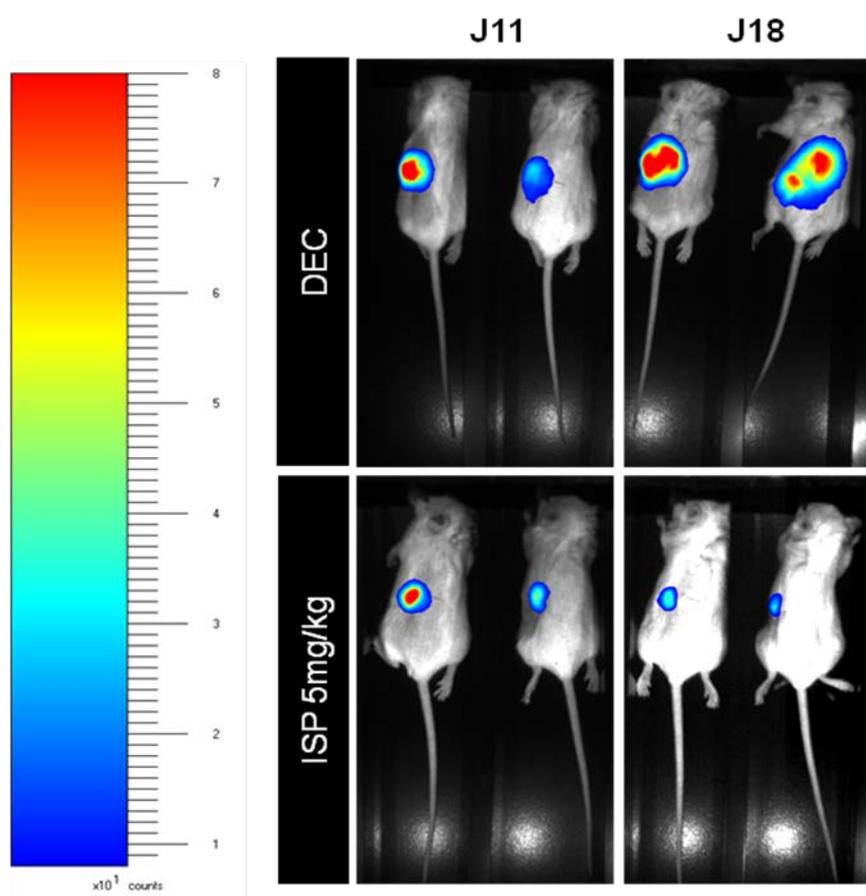


Figure 66 : Effet de l'ispinesib sur l'évolution du volume tumoral des tumeurs Renca implantées chez la souris BalbC. Les tumeurs Renca sont observées au Biospace après injection de luciférine en intrapéritonéal. L'effet de l'ispinesib sur le volume tumoral peut être apprécié en comparant le groupe ayant reçu le solvant (DEC) au groupe traité à l'ispinesib mesylate (ISP).

Afin de pouvoir comparer le rein tumoral au rein non implanté, l'appareil urinaire des souris est récupéré. Dans les contrôles, les tumeurs sont assez hétérogènes en taille et il est possible de les répartir en deux groupes:

- Un groupe composé de 6 tumeurs qui pèsent en dessous de 1g et représente 23% des tumeurs totales.
- Un groupe composé de 16 tumeurs volumineuses dont les poids varie entre 1,5g et 3.7g. La moyenne de poids est autour de 2 grammes et ce groupe représente 77% des tumeurs totales. (figure 67).

Par contre, les tumeurs traitées à l'ispinesib sont moins hétérogènes. Le poids moyen des tumeurs ispinesib est de 0,7 grammes (soit environ trois fois moins lourdes que les contrôles). Ce poids est significativement plus faible dans ces tumeurs comparé aux contrôles (figure 67b).

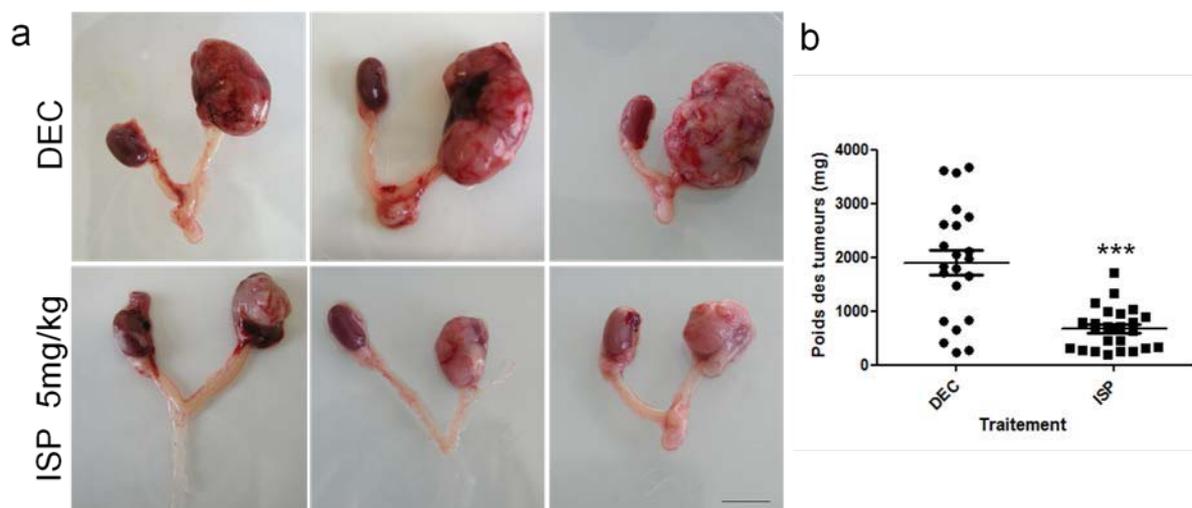


Figure 67: Le traitement des souris à l'ispinesib réduit le volume tumoral des carcinomes rénaux. Bimicroscopie des tumeurs Renca contrôle et traitées à l'ispinesib (5mg/kg) (a). Représentation graphique du poids des tumeurs dans le groupe contrôle (n=22) et le groupe traité à l'ispinesib (n=24) (b).

La croissance des tumeurs Renca xéno greffées chez la souris est inhibée par le traitement anti-Eg5. Afin de déterminer si cette réduction du volume tumoral pourrait être due à un défaut vasculaire, des immuno-marquages des vaisseaux par CD31 et NG2 (marqueur des péricytes) ont été réalisés. Ceux-ci révèlent que les tumeurs contrôles sont denses et très vascularisées par rapport aux tumeurs traitées à l'ispinesib. Les vaisseaux dans ces tumeurs traitées à l'ispinesib sont négatifs pour NG2 ce qui suggère qu'ils ne sont pas entourés par les péricytes. Au niveau des cellules tumorales, se distinguent deux types de tumeurs ispinesib :

- Des tumeurs dont les noyaux des cellules tumorales sont anormaux (multilobés et plus gros) possiblement en apoptose.

- Des tumeurs denses au niveau tumoral avec des noyaux « normaux » mais un réseau vasculaire affecté (*figure 68a,b*). Des CE très épaisses sont visibles sur certaines coupes (*figure 68f*).

La vascularisation des tumeurs a été quantifiée en attribuant un score angiogénique à chaque tumeur. La diminution de la vascularisation des tumeurs en ispinesib est significative (*figure 68g*).

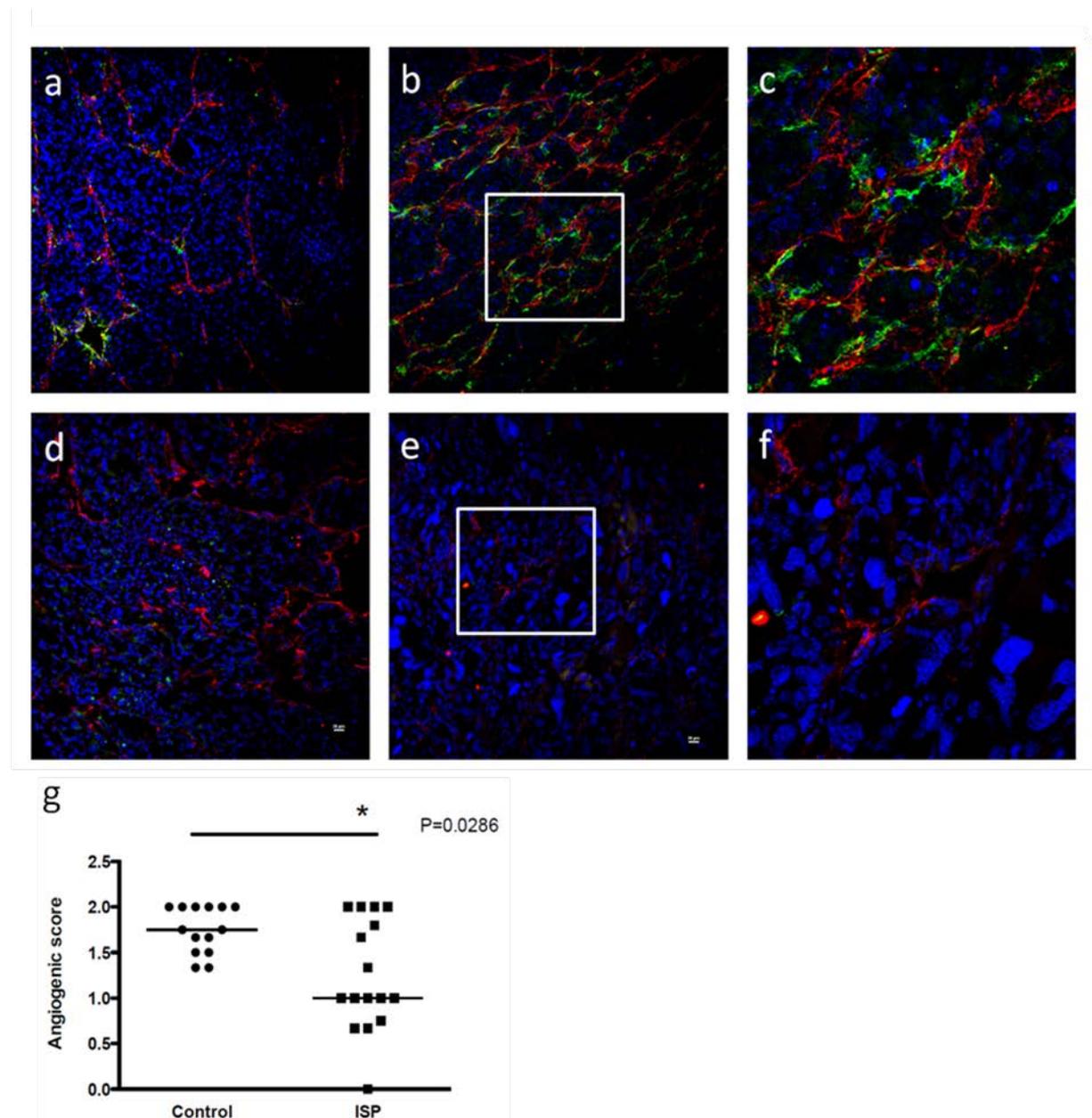


Figure 68: Vascularisation des tumeurs Renca traitées à l'ispinesib mesylate. Immuno-marquage des vaisseaux par CD31 (en rouge) et des péricytes par NG2 (en vert) sur des tumeurs témoins (a, b) et traitées avec l'ispinesib (d, e). Agrandissement de l'encadré de la tumeur témoin (c) et de la tumeur ispinesib (f). Test en aveugle pour quantification de la vascularisation des tumeurs Renca (g).

L'inhibition d'Eg5 par l'ispinesib diminue la vascularisation des tumeurs Renca mais affecte aussi les cellules tumorales.

2.3) Le SB-743921 inhibe la vascularisation des tumeurs Renca

Etant donné la reproductibilité des résultats obtenus avec l'ispinesib dans le RCC, l'inhibiteur d'Eg5, le SB-743921 (cinq fois plus puissant que l'ispinesib) a aussi été testé sur le carcinome rénal. Les tumeurs traitées avec le SB-743921 sont significativement plus petites que les tumeurs des souris qui ont reçu le solvant, le diacétylacétamide (DA) ($p=0,036$). Néanmoins, certaines tumeurs traitées au SB-743921 sont aussi volumineuses que des tumeurs témoins.

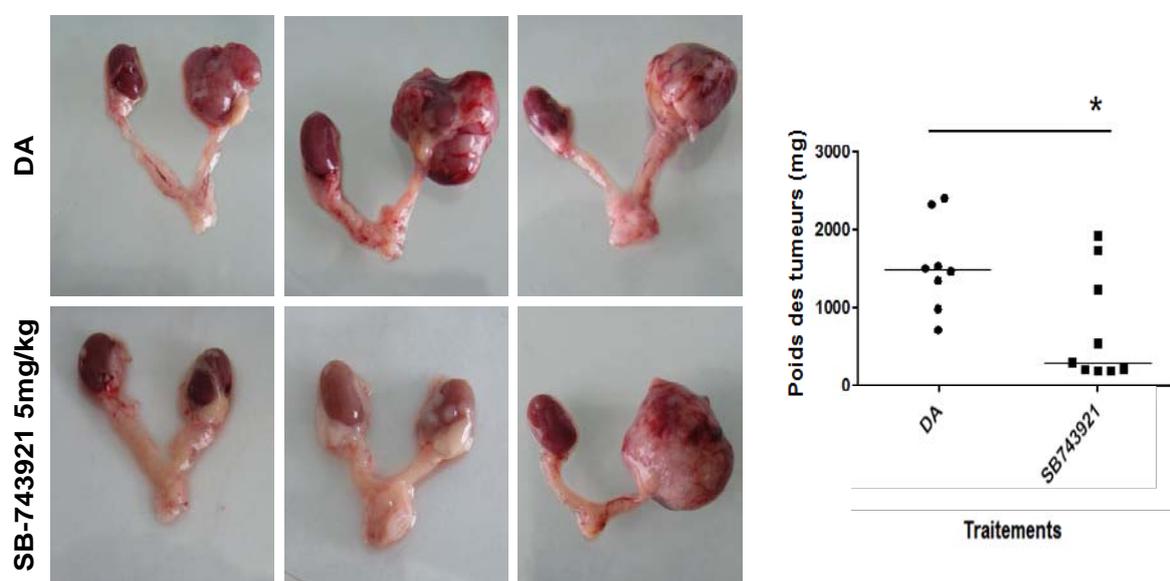


Figure 69: Effet hétérogène du traitement au SB-743921 sur le volume tumoral des carcinomes rénaux. Biomicroscopie des tumeurs Renca témoins (DA) et traitées au SB-743921 (5mg/kg). Représentation graphique du poids des tumeurs dans le groupe contrôle (n=8) et le groupe traité avec le SB-743921 (n=10).

Par la suite, nous nous sommes intéressés à ces grosses tumeurs traitées par le SB-743921 qui avaient échappé au traitement. La coloration hématoxyline/éosine effectuée sur les coupes de tumeurs Renca révèle que les tumeurs dans lesquelles Eg5 a été inhibé sont moins denses au niveau des cellules tumorales. Les noyaux cellulaires marqués par le DAPI apparaissent plus gros et déformés dans les tumeurs traitées avec SB-743921 comparé à ceux dans les contrôles. De plus, les tumeurs traitées au SB-743921 sont moins vascularisées que les tumeurs témoins et leurs vaisseaux ne sont pas entourés par les péricytes comparé aux tumeurs témoins (*figure 70a,b*). Ces observations suggèrent que le traitement anti-Eg5 inhibe la maturation des vaisseaux.

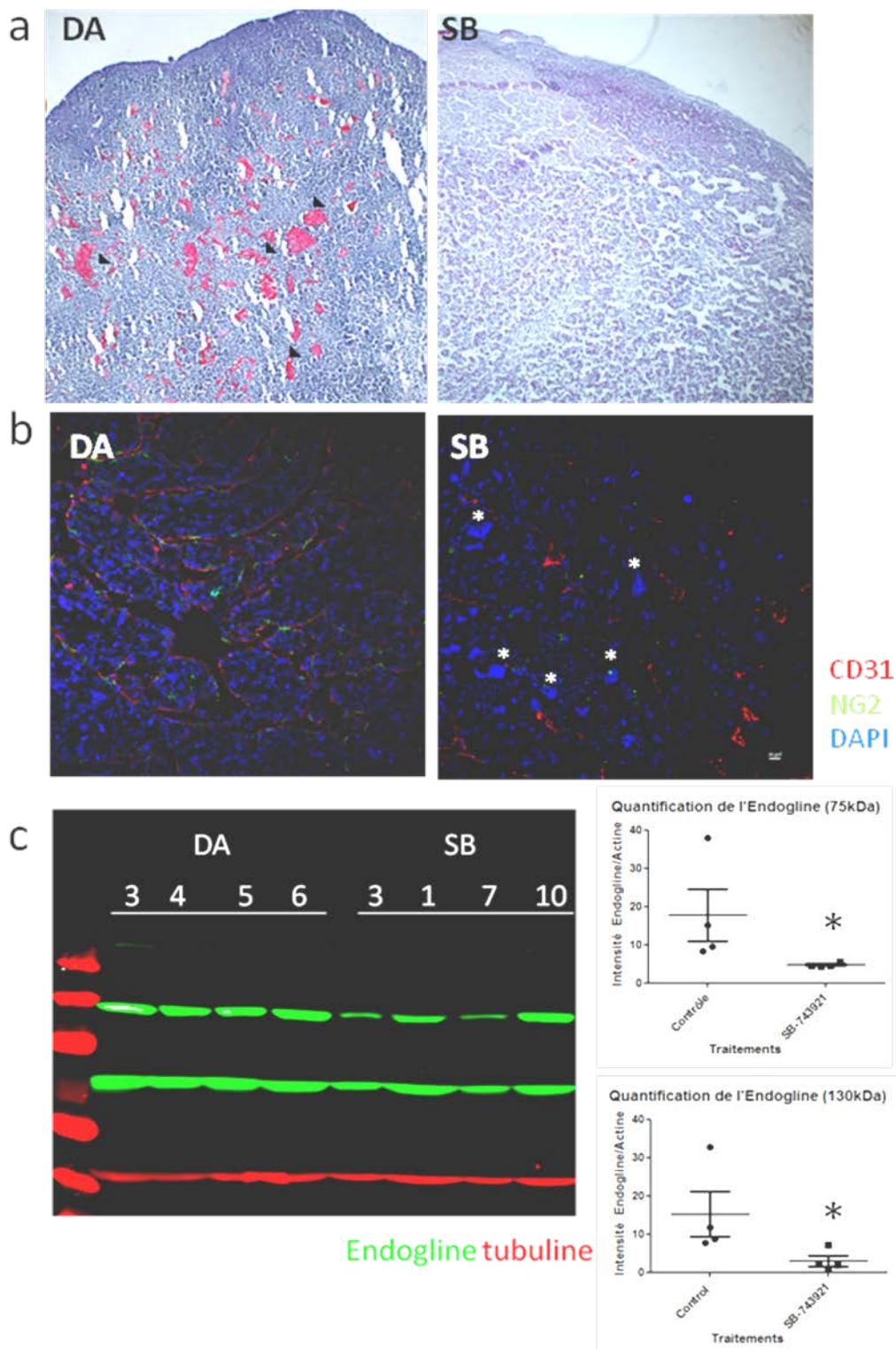


Figure 70: Le SB-743921 réduit la densité vasculaire et tumorale des tumeurs Renca. Coloration hématoxyline/éosine sur coupes de tumeurs Renca (a). La barre de calibration indique 500µm. Immuno-marquage des vaisseaux et des péricytes. Les vaisseaux sont marqués par CD31 en rouge et les péricytes par NG2 en vert, le DAPI marque les noyaux en bleu (b). Immuno-blot réalisé sur 4 tumeurs du groupe contrôle (DA) et du groupe (SB). L'endogline est marquée par l'IrDye 800 qui fluoresce dans le vert et la tubuline (protéine de référence) est marquée par l'IrDye 700 qui fluoresce dans le rouge. Les quantifications du western blot des deux bandes d'endogline sont normalisées en fonction de la tubuline. (Test de Mann-Whitney $p < 0.05$) (c).

Le marqueur endothélial l'endogline, a été quantifié dans les tumeurs. Deux bandes correspondant à l'endogline ont été observées (l'une à 75 kDa et l'autre à 130 kDa). Les statistiques réalisées sur les quantifications de l'intensité de fluorescence de ces deux bandes, révèlent que les tumeurs SB expriment moins d'endogline que les tumeurs contrôles et ce de manière significative ($p=0.0286$ pour la bande à 75kDa et $p=0.0286$ pour la bande à 130kDa) (*figure 70c*).

Les expériences réalisées avec le SB-743921 donnent des résultats hétérogènes au niveau de la régression tumorale. Néanmoins, les immuno-marquages et les immuno-blots montrent que la vascularisation des tumeurs traitées au SB-743921 est affectée et les noyaux des cellules tumorales sont anormaux.

*Conclusion
générale et
perspectives*

Au cours des dernières années, l'angiogenèse tumorale est devenue une cible populaire dans de nombreux cancers solides. Mais la fréquence des récurrences après un traitement anti-angiogénique tel que l'Avastin, ajouté au fait que certains patients ne supportent pas ces traitements, soulève l'importance de trouver de nouveaux agents anti-angiogéniques. Pour identifier des nouveaux régulateurs de l'angiogenèse dans la signalisation du VEGF, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des CAM d'embryon de poulet.

La kinésine Eg5, une cible d'agents anticancéreux en clinique, a été révélée dans le criblage comme étant fortement induite par le VEGF. D'autres kinésines mitotiques moins étudiées dans le domaine du cancer, ont été également induites par la stimulation au VEGF. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux kinésines Eg5 et MKLP-2.

Nous avons démontré un rôle des kinésines Eg5 et MKLP-2 dans l'angiogenèse, indépendamment de leurs fonctions mitotiques.

L'inhibition d'Eg5 par les inhibiteurs ou par les siRNA KIF11 provoque un phénotype particulier des cellules. Celles-ci deviennent rondes et plus réfringentes ce qui suggère qu'elles sont moins adhérentes comme les cellules en mitose. En effet, Eg5 est responsable de la formation du fuseau bipolaire et une fois inhibée, les cellules restent bloquées en phase G2 de mitose. Cette kinésine étant très conservée dans les différents types cellulaires et entre les espèces, nous avons démontré que les inhibiteurs d'Eg5 inhibent aussi bien la prolifération de cellules tumorales humaines (U87, T98G, SF126 et SF188) ou murines (GL261, Renca) que la prolifération de cellules endothéliales humaines (HUVEC, HUAEC) ou bovines (ABAE).

L'adhérence des cellules migrantes à la MEC est critique dans l'angiogenèse puisqu'elle est à l'origine d'un processus majeur : la migration des CE. Nous avons observé que l'inhibition d'Eg5 réduit l'adhérence des HUVEC ainsi que leur étalement sur différentes matrices. Certaines kinésines sont connues pour permettre le transport de molécules d'adhésion comme dans le cas de KIF3 qui permet le transport des vésicules contenant la N-Cadhérine et la β -Caténine. Étant donné la configuration d'Eg5, il est peut-être probable qu'elle puisse directement se lier à des vésicules pour permettre le recrutement à la membrane de protéines d'adhérence ; mais sa fonction dans le processus d'adhérence pourrait être attribuée à des partenaires protéiques, qu'il sera donc primordial d'identifier.

Nous avons également mis en évidence un ralentissement de la migration des HUVEC après inhibition chimique ou par interférence d'Eg5/KIF11. Ce processus par lequel l'inhibition d'Eg5 interfère avec la migration des HUVEC, est potentiellement dû au défaut d'adhérence des cellules endothéliales aux matrices.

L'étude du rôle de la kinésine Eg5 dans l'angiogenèse physiologique a été réalisée en collaboration avec la plateforme GIGA Zebrafish et l'équipe de Joerg Wilting. L'injection d'un morpholino contre KIF11 au cours des premières heures du développement du poisson zèbre a entraîné des défauts vasculaires tels que des vaisseaux intersomitiques altérés (bourgeoisements aléatoires, des défauts de connexion de la veine dorsolatérale anastomosique, des oedèmes péricardiaques.

L'injection de diméthylénastrol dans la vésicule allantoïdienne de l'embryon de poulet a considérablement diminué le développement de celle-ci.

Ces observations obtenues *in vivo* ne peuvent pas exclure un rôle prolifératif d'Eg5, mais confirme l'importance de la kinésine dans la construction des vaisseaux sanguins.

Le cancer est caractérisé par une prolifération cellulaire élevée et il est connu que les inhibiteurs d'Eg5 bloquent la prolifération des cellules tumorales et induisent leur apoptose. Hors, les tumeurs ne sont pas composées exclusivement de cellules tumorales mais aussi de cellules stromales. Pourtant, les effets de ces agents ont été étudiés uniquement dans les cellules tumorales.

Dans les expériences de xénogreffes de cellules tumorales sur animaux (souris ou CAM de poulet), l'inhibition d'Eg5 par le DMN ou l'ispinesib réduit de manière significative le volume tumoral. De plus, les immuno-marquages révèlent que les vaisseaux sont affectés par le traitement anti-Eg5. Ces résultats suggèrent deux mécanismes potentiels d'inhibition de la croissance tumorale par le traitement anti-Eg5:

- Les CE sont affectées directement par le traitement anti-Eg5 au niveau de leur prolifération, leur adhérence et leur migration, ce qui entraîne une réduction de l'angiogenèse et la tumeur qui n'est plus alimentée en nutriments et en oxygène décline.
- Les cellules tumorales étant affectées par le traitement anti-Eg5, leur nombre diminue, il y a donc moins de sécrétion de facteurs pro-angiogéniques afin de stimuler une angiogenèse, d'où le fait qu'il y a moins de vaisseaux dans ces tumeurs.

La détermination des cellules les plus sensibles aux traitements *in vivo*, via la quantification de l'apoptose dans les CE comparée à celle des cellules tumorales, pourrait clarifier les hypothèses. Il est très possible que les deux mécanismes soient interdépendants.

Dans notre étude, les résultats obtenus avec les inhibiteurs d'Eg5, l'ispinesib et le SB-743921 dans le carcinome rénal semblent prometteurs, pourtant dans les essais cliniques ces drogues sont moins efficaces. Récemment, des mutations de KIF11 associées à des défauts vasculaires, ont été identifiées chez l'humain. Il serait donc intéressant de vérifier si KIF11 a subi des mutations chez des patients atteints de cancer. Si tel était le cas, cela pourrait permettre de réguler l'utilisation des inhibiteurs d'Eg5 en clinique.

Concernant la kinésine MKLP-2, les résultats obtenus *in vitro* et *ex vivo* avec l'inhibiteur le paprotrain suggèrent que cette kinésine pourrait être impliquée dans la migration des cellules. A l'heure actuelle, aucune publication ne montre l'effet *in vivo* du paprotrain, mais nos résultats, ainsi qu'une analyse Oncomine qui a mis en évidence une corrélation importante entre la vascularisation du carcinome hépatocellulaire et les niveaux d'ARNm de KIF20A suggèrent que cette kinésine pourrait être une cible intéressante pour des agents anti-angiogéniques. De plus, il a été rapporté un rôle anti-angiogénique pour la génistéine, dont l'effet passerait par l'inhibition de MKLP-2.

Pourtant des expériences réalisées avec le paprotrain sur le modèle de GBM sur la CAM de poulet ne sont pas concluants (données non montrées). Ceci pourrait être du à une dose trop faible de l'inhibiteur, utilisé *in vitro* à des concentrations importantes (autour de 20 μ M). Ces résultats soulèvent l'importance de la synthèse de nouveaux inhibiteurs plus spécifiques pour cette kinésine ou avec une meilleure biodisponibilité et leur utilisation dans des modèles de tumeur xénotransplantés chez l'animal.

En conclusion, la fonction des cellules endothéliales est une cible des kinésines mitotiques et les données issues de cette thèse pourront permettre de mieux adapter les traitements anti-Eg5 actuellement utilisés en clinique.

Références

- Abbott, N. J., Ronnback, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews Neuroscience* 7, 41-53.
- Aguzzi, M. S., Fortugno, P., Giampietri, C., Ragone, G., Capogrossi, M. C., and Facchiano, A. (2010). Intracellular targets of RGDS peptide in melanoma cells. *Molecular cancer* 9, 84.
- Alitalo, K., and Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer cell* 1, 219-227.
- Andrews, P. D., Ovechkina, Y., Morrice, N., Wagenbach, M., Duncan, K., Wordeman, L., and Swedlow, J. R. (2004). Aurora B regulates MCAK at the mitotic centromere. *Developmental cell* 6, 253-268.
- Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H. K., and Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis* 12, 267-274.
- Arnaoutova, I., and Kleinman, H. K. (2010). In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nature protocols* 5, 628-635.
- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., and Akhtar, N. (2003). Angiogenesis assays: a critical overview. *Clinical chemistry* 49, 32-40.
- Auguste, P., Lemièrre, S., Larrieu-Lahargue, F., and Bikfalvi, A. (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Critical reviews in oncology/hematology* 54, 53-61.
- Ausprunk, D. H., and Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvascular research* 14, 53-65.
- Bakhom, S. F., Thompson, S. L., Manning, A. L., and Compton, D. A. (2009). Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nature cell biology* 11, 27-35.
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). [Epidemiology of glioblastoma]. *Neuro-Chirurgie* 56, 433-440.
- Bartoli, K. M., Jakovljevic, J., Woolford, J. L., Jr., and Saunders, W. S. (2011). Kinesin molecular motor Eg5 functions during polypeptide synthesis. *Molecular biology of the cell* 22, 3420-3430.
- Basto, R., Brunk, K., Vinadogrova, T., Peel, N., Franz, A., Khodjakov, A., and Raff, J. W. (2008). Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell* 133, 1032-1042.
- Bergers, G., and Hanahan, D. (2008). Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nature reviews* 8, 592-603.
- Bertran, M. T., Sdelci, S., Regue, L., Avruch, J., Caelles, C., and Roig, J. (2011). Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *The EMBO journal* 30, 2634-2647.
- Bikfalvi, A. (2003). [Tumor angiogenesis]. *Bulletin du cancer* 90, 449-458.
- Bikfalvi, A. (2007). Angiogenesis: molecular mechanisms of activation, promotion and maintenance. *J Buon* 12 Suppl 1, S59-66.
- Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.

- Bonanno, E., and Nicosia, R. F. (1992). Ring formation in cultures of rat aortic smooth muscle cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A, 703-704.
- Bonsib, S. M. (2004). The renal sinus is the principal invasive pathway: a prospective study of 100 renal cell carcinomas. *The American journal of surgical pathology* 28, 1594-1600.
- Brooks, P. C. (1996). Cell adhesion molecules in angiogenesis. *Cancer metastasis reviews* 15, 187-194.
- Brooks, P. C., Clark, R. A., and Chersesh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, NY)* 264, 569-571.
- Buster, D. W., Baird, D. H., Yu, W., Solowska, J. M., Chauviere, M., Mazurek, A., Kress, M., and Baas, P. W. (2003). Expression of the mitotic kinesin Kif15 in postmitotic neurons: implications for neuronal migration and development. *Journal of neurocytology* 32, 79-96.
- Carmeliet, P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. *Journal of internal medicine* 255, 538-561.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473, 298-307.
- Castillo, A., Morse, H. C., 3rd, Godfrey, V. L., Naeem, R., and Justice, M. J. (2007). Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer research* 67, 10138-10147.
- Chambers, R. C., Leoni, P., Kaminski, N., Laurent, G. J., and Heller, R. A. (2003). Global expression profiling of fibroblast responses to transforming growth factor-beta1 reveals the induction of inhibitor of differentiation-1 and provides evidence of smooth muscle cell phenotypic switching. *The American journal of pathology* 162, 533-546.
- Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in cell biology* 11, S37-43.
- Childs, E. W., Tharakan, B., Hunter, F. A., Tinsley, J. H., and Cao, X. (2007). Apoptotic signaling induces hyperpermeability following hemorrhagic shock. *American journal of physiology* 292, H3179-3189.
- Cho, H. J., Kim, S. J., Ha, U. S., Hong, S. H., Kim, J. C., Choi, Y. J., and Hwang, T. K. (2009). Prognostic value of capsular invasion for localized clear-cell renal cell carcinoma. *European urology* 56, 1006-1012.
- Chow, L. Q., and Eckhardt, S. G. (2007). Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 25, 884-896.
- Chu, P. J., Rivera, J. F., and Arnold, D. B. (2006). A role for Kif17 in transport of Kv4.2. *The Journal of biological chemistry* 281, 365-373.
- Claerhout, S., Lim, J. Y., Choi, W., Park, Y. Y., Kim, K., Kim, S. B., Lee, J. S., Mills, G. B., and Cho, J. Y. (2012). Gene expression signature analysis identifies vorinostat as a candidate therapy for gastric cancer. *PloS one* 6, e24662.
- Claxton, S., and Fruttiger, M. (2004). Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Expr Patterns* 5, 123-127.
- Cohen, D., Lane, B., Jin, T., Magi-Galluzzi, C., Finke, J., Rini, B. I., Bukowski, R. M., and Zhou, M. (2007). The prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression

in clear-cell renal cell carcinoma: a call for standardized methods for immunohistochemical evaluation. *Clinical genitourinary cancer* 5, 264-270.

Cohn, S. (1987). Microtubule activation of kinesin ATPase activity. *Nature* 326, 16-17.

Darland, D. C., and D'Amore, P. A. (2001). Cell-cell interactions in vascular development. *Current topics in developmental biology* 52, 107-149.

Davis, D. A., Sarkar, S. H., Hussain, M., Li, Y., and Sarkar, F. H. (2006). Increased therapeutic potential of an experimental anti-mitotic inhibitor SB715992 by genistein in PC-3 human prostate cancer cell line. *BMC cancer* 6, 22.

Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Ryan, T. E., Bruno, J., Radziejewski, C., Maisonpierre, P. C., and Yancopoulos, G. D. (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell* 87, 1161-1169.

de Groot, J. F., Fuller, G., Kumar, A. J., Piao, Y., Eterovic, K., Ji, Y., and Conrad, C. A. (2010). Tumor invasion after treatment of glioblastoma with bevacizumab: radiographic and pathologic correlation in humans and mice. *Neuro-oncology* 12, 233-242.

DeBonis, S., Simorre, J. P., Crevel, I., Lebeau, L., Skoufias, D. A., Blangy, A., Ebel, C., Gans, P., Cross, R., Hackney, D. D., et al. (2003). Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. *Biochemistry* 42, 338-349.

DeRuiter, M. C., Poelmann, R. E., VanMunsteren, J. C., Mironov, V., Markwald, R. R., and Gittenberger-de Groot, A. C. (1997). Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins in vivo and in vitro. *Circulation research* 80, 444-451.

Diefenbach, R. J., Diefenbach, E., Douglas, M. W., and Cunningham, A. L. (2002). The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23. *Biochemistry* 41, 14906-14915.

Djonov, V., Baum, O., and Burri, P. H. (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell and tissue research* 314, 107-117.

Dorrell, M. I., and Friedlander, M. (2006). Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Progress in retinal and eye research* 25, 277-295.

Dreves, J., Konerding, M. A., Wolloscheck, T., Wedge, S. R., Ryan, A. J., Ogilvie, D. J., and Esser, N. (2004). The VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, ZD6474, inhibits angiogenesis and affects microvascular architecture within an orthotopically implanted renal cell carcinoma. *Angiogenesis* 7, 347-354.

Dreves, J., Muller-Driver, R., Wittig, C., Fuxius, S., Esser, N., Hugenschmidt, H., Konerding, M. A., Allegrini, P. R., Wood, J., Hennig, J., (2002). PTK787/ZK 222584, a specific vascular endothelial growth factor-receptor tyrosine kinase inhibitor, affects the anatomy of the tumor vascular bed and the functional vascular properties as detected by dynamic enhanced magnetic resonance imaging. *Cancer research* 62, 4015-4022.

Ebos, J.M.L., Lee C., Cruz-Munoz W., Bjarnason G.A., Christensen J.G (2009). Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 15, 232-239.

Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapere, J. J., Rousselet, A., Janoueix-Lerosey, I., and Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science (New York, NY)* 279, 580-585.

- Eckerich, C., Zapf, S., Fillbrandt, R., Loges, S., Westphal, M., and Lamszus, K. (2007). Hypoxia can induce c-Met expression in glioma cells and enhance SF/HGF-induced cell migration. *International journal of cancer* 121, 276-283.
- Eilken, H. M., and Adams, R. H. (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Current opinion in cell biology* 22, 617-625.
- Ellis, L. M., and Hicklin, D. J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews* 8, 579-591.
- Ema, M., Takahashi, S., and Rossant, J. (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* 107, 111-117.
- Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *Journal of cell science* 111 (Pt 13), 1853-1865.
- Faivre, S., Demetri, G., Sargent, W., and Raymond, E. (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 6, 734-745.
- Falcieri, E., Martelli, A. M., Bareggi, R., Cataldi, A., and Cocco, L. (1993). The protein kinase inhibitor staurosporine induces morphological changes typical of apoptosis in MOLT-4 cells without concomitant DNA fragmentation. *Biochemical and biophysical research communications* 193, 19-25.
- Falnikar, A., Tole, S., and Baas, P. W. (2011). Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. *Molecular biology of the cell* 22, 1561-1574.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., and Novotny, W. (2005). Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochemical and biophysical research communications* 333, 328-335.
- Florian, S., and Mayer, T. U. (2011). Modulated microtubule dynamics enable Hk1p2/Kif15 to assemble bipolar spindles. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 10, 3533-3544.
- Folberg, R., and Maniotis, A. J. (2004). Vasculogenic mimicry. *Apmis* 112, 508-525.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine* 133, 275-288.
- Fontijn, R. D., Goud, B., Echard, A., Jollivet, F., van Marle, J., Pannekoek, H., and Horrevoets, A. J. (2001). The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis. *Molecular and cellular biology* 21, 2944-2955.
- Ganem, N. J., Godinho, S. A., and Pellman, D. (2009). A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* 460, 278-282.
- Gasnereau, I., Boissan, M., Margall-Ducos, G., Couchy, G., Wendum, D., Bourgain-Guglielmetti, F., Desdouets, C., Lacombe, M. L., Zucman-Rossi, J., and Sobczak-Thepot, J. (2012). KIF20A mRNA and its product MK1p2 are increased during hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology* 180, 131-140.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., and Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of cell biology* 161, 1163-1177.
- Goldman, C. K., Kim, J., Wong, W. L., King, V., Brock, T., and Gillespie, G. Y. (1993). Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human

malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Molecular biology of the cell* 4, 121-133.

Good, J. A., Skoufias, D. A., and Kozielski, F. (2011). Elucidating the functionality of kinesins: an overview of small molecule inhibitors. *Seminars in cell & developmental biology* 22, 935-945.

Gruneberg, U., Neef, R., Honda, R., Nigg, E. A., and Barr, F. A. (2004). Relocation of Aurora B from centromeres to the central spindle at the metaphase to anaphase transition requires MKlp2. *The Journal of cell biology* 166, 167-172.

Gruneberg, U., Neef, R., Li, X., Chan, E. H., Chalamalasetty, R. B., Nigg, E. A., and Barr, F. A. (2006). KIF14 and citron kinase act together to promote efficient cytokinesis. *The Journal of cell biology* 172, 363-372.

Gupta, M. K., and Qin, R. Y. (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol* 9, 1144-1155.

Hagedorn, M., Balke, M., Schmidt, A., Bloch, W., Kurz, H., Javerzat, S., Rousseau, B., Wilting, J., and Bikfalvi, A. (2004). VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn* 230, 23-33.

Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A., and Bikfalvi, A. (2005). Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 1643-1648.

Hagedorn, M., Zilberberg, L., Wilting, J., Canron, X., Carrabba, G., Giussani, C., Pluderi, M., Bello, L., and Bikfalvi, A. (2002). Domain swapping in a COOH-terminal fragment of platelet factor 4 generates potent angiogenesis inhibitors. *Cancer research* 62, 6884-6890.

Hammer, J. A., 3rd, and Sellers, J. R. (2012). Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 13-26.

Haque, S. A., Hasaka, T. P., Brooks, A. D., Lobanov, P. V., and Baas, P. W. (2004). Monastrol, a prototype anti-cancer drug that inhibits a mitotic kinesin, induces rapid bursts of axonal outgrowth from cultured postmitotic neurons. *Cell motility and the cytoskeleton* 58, 10-16.

Hardee, M. E., and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *The American journal of pathology* 181, 1126-1141.

Hellstrom, M., Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., and Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology* 153, 543-553.

Hill, E., Clarke, M., and Barr, F. A. (2000). The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *The EMBO journal* 19, 5711-5719.

Hirokawa, N., Noda, Y., Tanaka, Y., and Niwa, S. (2009). Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 682-696.

Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., and D'Amore, P. A. (1998). PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate. *The Journal of cell biology* 141, 805-814.

Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiotensins and VEGF. *Science (New York, NY)* 284, 1994-1998.

- Holen, K. D., Belani, C. P., Wilding, G., Ramalingam, S., Volkman, J. L., Ramanathan, R. K., Vasist, L. S., Bowen, C. J., Hodge, J. P., Dar, M. M., and Ho, P. T. (2011). A first in human study of SB-743921, a kinesin spindle protein inhibitor, to determine pharmacokinetics, biologic effects and establish a recommended phase II dose. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 67, 447-454.
- Huszar, D., Theoclitou, M. E., Skolnik, J., and Herbst, R. (2009). Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer metastasis reviews* 28, 197-208.
- Imai, K., Hirata, S., Irie, A., Senju, S., Ikuta, Y., Yokomine, K., Harao, M., Inoue, M., Tomita, Y., Tsunoda, T., et al. (2011). Identification of HLA-A2-restricted CTL epitopes of a novel tumour-associated antigen, KIF20A, overexpressed in pancreatic cancer. *British journal of cancer* 104, 300-307.
- Infante, J. R., Kurzrock, R., Spratlin, J., Burris, H. A., Eckhardt, S. G., Li, J., Wu, K., Skolnik, J. M., Hylander-Gans, L., Osmukhina, A., et al. (2012). A Phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 69, 165-172.
- Jain, R. K., di Tomaso, E., Duda, D. G., Loeffler, J. S., Sorensen, A. G., and Batchelor, T. T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nature reviews Neuroscience* 8, 610-622.
- Jantsch-Plunger, V., Gonczy, P., Romano, A., Schnabel, H., Hamill, D., Schnabel, R., Hyman, A. A., and Glotzer, M. (2000). CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *The Journal of cell biology* 149, 1391-1404.
- Jubb, A. M., Pham, T. Q., Hanby, A. M., Frantz, G. D., Peale, F. V., Wu, T. D., Koeppen, H. W., and Hillan, K. J. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor, hypoxia inducible factor 1alpha, and carbonic anhydrase IX in human tumours. *Journal of clinical pathology* 57, 504-512.
- Kantarjian, H. M., Padmanabhan, S., Stock, W., Tallman, M. S., Curt, G. A., Li, J., Osmukhina, A., Wu, K., Huszar, D., Borthukar, G., et al. (2012). Phase I/II multicenter study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD4877 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Investigational new drugs* 30, 1107-1115.
- Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *The Journal of cell biology* 150, 975-988.
- Karamysheva, A. F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry* 73, 751-762.
- Kaur, B., Tan, C., Brat, D. J., Post, D. E., and Van Meir, E. G. (2004). Genetic and hypoxic regulation of angiogenesis in gliomas. *Journal of neuro-oncology* 70, 229-243.
- Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E., and Alexander, J. S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *The Journal of biological chemistry* 273, 15099-15103.
- Kim, J. K., Shin, E. K., Kang, Y. H., and Park, J. H. (2011). Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a chinese antileukemia medicine, inhibits angiogenesis. *Journal of cellular biochemistry* 112, 1384-1391.
- Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., and Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 61, 215-225; discussion 226-219.

- Kohn, S., Nagy, J. A., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M. (1992). Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 67, 596-607.
- Koochekpour, S., Merzak, A., and Pilkington, G. J. (1996). Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells in vitro. *Cancer letters* 102, 209-215.
- Krick, S., Eul, B. G., Hanze, J., Savai, R., Grimminger, F., Seeger, W., and Rose, F. (2005). Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 32, 395-403.
- Kurz, H., Burri, P. H., and Djonov, V. G. (2003). Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 18, 65-70.
- Kwon, M., Godinho, S. A., Chandhok, N. S., Ganem, N. J., Azoune, A., They, M., and Pellman, D. (2008). Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes & development* 22, 2189-2203.
- Lad, L., Luo, L., Carson, J. D., Wood, K. W., Hartman, J. J., Copeland, R. A., and Sakowicz, R. (2008). Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry* 47, 3576-3585.
- Lal, B. K., Varma, S., Pappas, P. J., Hobson, R. W., 2nd, and Duran, W. N. (2001). VEGF increases permeability of the endothelial cell monolayer by activation of PKB/akt, endothelial nitric-oxide synthase, and MAP kinase pathways. *Microvascular research* 62, 252-262.
- Lamalice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circulation research* 100, 782-794.
- Lawson, N. D., and Weinstein, B. M. (2002). Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nature reviews Genetics* 3, 674-682.
- Le Guellec, R., Paris, J., Couturier, A., Roghi, C., and Philippe, M. (1991). Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular and cellular biology* 11, 3395-3398.
- Lee, Y. M., Kim, E., Park, M., Moon, E., Ahn, S. M., Kim, W., Hwang, K. B., Kim, Y. K., Choi, W., and Kim, W. (2010). Cell cycle-regulated expression and subcellular localization of a kinesin-8 member human KIF18B. *Gene* 466, 16-25.
- Leon, S. P., Folkert, R. D., and Black, P. M. (1996). Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors. *Cancer* 77, 362-372.
- Levesque, A. A., and Compton, D. A. (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *The Journal of cell biology* 154, 1135-1146.
- Li, J., Xu, Y., and Chong, K. (2012). The novel functions of kinesin motor proteins in plants. *Protoplasma* 249 Suppl 2, 95-100.
- Lindhahl, P., Johansson, B. R., Leveen, P., and Betsholtz, C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science (New York, NY)* 277, 242-245.
- Liu, M., Yu, H., Huo, L., Liu, J., Li, M., and Zhou, J. (2008). Validating the mitotic kinesin Eg5 as a therapeutic target in pancreatic cancer cells and tumor xenografts using a specific inhibitor. *Biochemical pharmacology* 76, 169-178.

- Lu, Y., Liu, P., Wen, W., Grubbs, C. J., Townsend, R. R., Malone, J. P., Lubet, R. A., and You, M. (2010). Cross-species comparison of orthologous gene expression in human bladder cancer and carcinogen-induced rodent models. *American journal of translational research* 3, 8-27.
- Lund, E. L., Hog, A., Olsen, M. W., Hansen, L. T., Engelholm, S. A., and Kristjansen, P. E. (2004). Differential regulation of VEGF, HIF1alpha and angiopoietin-1, -2 and -4 by hypoxia and ionizing radiation in human glioblastoma. *International journal of cancer* 108, 833-838.
- Luttun, A., Carmeliet, G., and Carmeliet, P. (2002). Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends in cardiovascular medicine* 12, 88-96.
- Mailhes, J. B., Mastromatteo, C., and Fuseler, J. W. (2004). Transient exposure to the Eg5 kinesin inhibitor monastrol leads to syntelic orientation of chromosomes and aneuploidy in mouse oocytes. *Mutation research* 559, 153-167.
- Maisonpierre, P. C., Suri, C., Jones, P. F., Bartunkova, S., Wiegand, S. J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T. H., Papadopoulos, N., et al. (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science (New York, NY)* 277, 55-60.
- Maliga, Z., Kapoor, T. M., and Mitchison, T. J. (2002). Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chemistry & biology* 9, 989-996.
- Maliga, Z., and Mitchison, T. J. (2006). Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol. *BMC chemical biology* 6, 2.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S., and Hendrix, M. J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* 155, 739-752.
- Manning, A. L., Ganem, N. J., Bakhoum, S. F., Wagenbach, M., Wordeman, L., and Compton, D. A. (2007). The kinesin-13 proteins Kif2a, Kif2b, and Kif2c/MCAK have distinct roles during mitosis in human cells. *Molecular biology of the cell* 18, 2970-2979.
- Mao, Y., Desai, A., and Cleveland, D. W. (2005). Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *The Journal of cell biology* 170, 873-880.
- Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. L., and Mitchison, T. J. (1999). Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science (New York, NY)* 286, 971-974.
- Mazumdar, M., Sundareshan, S., and Misteli, T. (2004). Human chromokinesin KIF4A functions in chromosome condensation and segregation. *The Journal of cell biology* 166, 613-620.
- Minchenko, A., Bauer, T., Salceda, S., and Caro, J. (1994). Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 71, 374-379.
- Mishima, M., Kaitna, S., and Glotzer, M. (2002). Central spindle assembly and cytokinesis require a kinesin-like protein/RhoGAP complex with microtubule bundling activity. *Developmental cell* 2, 41-54.
- Moriyama, T., Kataoka, H., Hamasuna, R., Yokogami, K., Uehara, H., Kawano, H., Goya, T., Tsubouchi, H., Koono, M., and Wakisaka, S. (1998). Up-regulation of vascular endothelial growth factor induced by hepatocyte growth factor/scatter factor stimulation in human glioma cells. *Biochemical and biophysical research communications* 249, 73-77.

- Muller, C., Gross, D., Sarli, V., Gartner, M., Giannis, A., Bernhardt, G., and Buschauer, A. (2007). Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 59, 157-164.
- Neef, R., Preisinger, C., Sutcliffe, J., Kopajtich, R., Nigg, E. A., Mayer, T. U., and Barr, F. A. (2003). Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *The Journal of cell biology* 162, 863-875.
- Noden, D. M. (1989). Embryonic origins and assembly of blood vessels. *The American review of respiratory disease* 140, 1097-1103.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., Di Patre, P. L., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N. M., Maiorka, P. C., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer research* 64, 6892-6899.
- Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda T., Okuyama, H, Vinals, F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D. and Casanovas O. (2009) Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.
- Pan, Q., Chantry, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., et al. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer cell* 11, 53-67.
- Pardanaud, L., Altmann, C., Kito, P., Dieterlen-Lievre, F., and Buck, C. A. (1987). Vasculogenesis in the early quail blastodisc as studied with a monoclonal antibody recognizing endothelial cells. *Development (Cambridge, England)* 100, 339-349.
- Pardanaud, L., Yassine, F., and Dieterlen-Lievre, F. (1989). Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development (Cambridge, England)* 105, 473-485.
- Parliament, M. B., Allalunis-Turner, M. J., Franko, A. J., Olive, P. L., Mandyam, R., Santos, C., and Wolokoff, B. (2000). Vascular endothelial growth factor expression is independent of hypoxia in human malignant glioma spheroids and tumours. *British journal of cancer* 82, 635-641.
- Passalidou, E., Trivella, M., Singh, N., Ferguson, M., Hu, J., Cesario, A., Granone, P., Nicholson, A. G., Goldstraw, P., Ratcliffe, C., et al. (2002). Vascular phenotype in angiogenic and non-angiogenic lung non-small cell carcinomas. *British journal of cancer* 86, 244-249.
- Patan, S., Munn, L. L., and Jain, R. K. (1996). Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvascular research* 51, 260-272.
- Patel-Hett, S., and D'Amore, P. A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *The International journal of developmental biology* 55, 353-363.
- Pepper, M. S. (2001). Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 21, 1104-1117.
- Poole, T. J., and Coffin, J. D. (1988). Developmental angiogenesis: quail embryonic vasculature. *Scanning microscopy* 2, 443-448.
- Potente, M., Gerhardt, H., and Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873-887.

- Presta, L. G., Chen, H., O'Connor, S. J., Chisholm, V., Meng, Y. G., Krummen, L., Winkler, M., and Ferrara, N. (1997). Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer research* 57, 4593-4599.
- Provis, J. M. (2001). Development of the primate retinal vasculature. *Progress in retinal and eye research* 20, 799-821.
- Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., and Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nature reviews* 2, 826-835.
- Rapley, J., Nicolas, M., Groen, A., Regue, L., Bertran, M. T., Caelles, C., Avruch, J., and Roig, J. (2008). The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. *Journal of cell science* 121, 3912-3921.
- Rath, O., and Kozielski, F. (2012). Kinesins and cancer. *Nature reviews* 12, 527-539.
- Reid, E., Kloos, M., Ashley-Koch, A., Hughes, L., Bevan, S., Svenson, I. K., Graham, F. L., Gaskell, P. C., Dearlove, A., Pericak-Vance, M. A., et al. (2002). A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *American journal of human genetics* 71, 1189-1194.
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S. J., Bidart, M., Feige, J. J., and Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* 119, 6162-6171.
- Rini, B. I., Campbell, S. C., and Escudier, B. (2009). Renal cell carcinoma. *Lancet* 373, 1119-1132.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674.
- Roskoski, R., Jr. (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Critical reviews in oncology/hematology* 62, 179-213.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W. C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 798-812.
- Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., et al. (2004). Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer research* 64, 3276-3280.
- Saunders, A. M., Powers, J., Strome, S., and Saxton, W. M. (2007). Kinesin-5 acts as a brake in anaphase spindle elongation. *Curr Biol* 17, R453-454.
- Schumacher, J. M., Golden, A., and Donovan, P. J. (1998). AIR-2: An Aurora/Ipl1-related protein kinase associated with chromosomes and midbody microtubules is required for polar body extrusion and cytokinesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *The Journal of cell biology* 143, 1635-1646.
- Sekine, Y., Okada, Y., Noda, Y., Kondo, S., Aizawa, H., Takemura, R., and Hirokawa, N. (1994). A novel microtubule-based motor protein (KIF4) for organelle transports, whose expression is regulated developmentally. *The Journal of cell biology* 127, 187-201.
- Semenza, G. L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29, 625-634.
- Serbedzija, G. N., Flynn, E., and Willett, C. E. (1999). Zebrafish angiogenesis: a new model for drug screening. *Angiogenesis* 3, 353-359.

- Setou, M., Seog, D. H., Tanaka, Y., Kanai, Y., Takei, Y., Kawagishi, M., and Hirokawa, N. (2002). Glutamate-receptor-interacting protein GRIP1 directly steers kinesin to dendrites. *Nature* 417, 83-87.
- Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K. D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Bernstein, A., and Rossant, J. (1997). A requirement for Flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell* 89, 981-990.
- Shannon, A. M., Bouchier-Hayes, D. J., Condron, C. M., and Toomey, D. (2003). Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer treatment reviews* 29, 297-307.
- Shannon, B. A., Cohen, R. J., Segal, A., Baker, E. G., and Murch, A. R. (2009). Clear cell renal cell carcinoma with smooth muscle stroma. *Human pathology* 40, 425-429.
- Sharma, N., Seftor, R. E., Seftor, E. A., Gruman, L. M., Heidger, P. M., Jr., Cohen, M. B., Lubaroff, D. M., and Hendrix, M. J. (2002). Prostatic tumor cell plasticity involves cooperative interactions of distinct phenotypic subpopulations: role in vasculogenic mimicry. *The Prostate* 50, 189-201.
- Shirakawa, K., Wakasugi, H., Heike, Y., Watanabe, I., Yamada, S., Saito, K., and Konishi, F. (2002). Vasculogenic mimicry and pseudo-comedo formation in breast cancer. *International journal of cancer* 99, 821-828.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359, 843-845.
- Smith, E., Hegarat, N., Vesely, C., Roseboom, I., Larch, C., Streicher, H., Straatman, K., Flynn, H., Skehel, M., Hirota, T., et al. (2011). Differential control of Eg5-dependent centrosome separation by Plk1 and Cdk1. *The EMBO journal* 30, 2233-2245.
- Sood, N., Sood, A., Sood, N. K., Aggarwal, S. P., Midha, V., and Pannu, H. S. (2001). Intrapulmonary vascular dilatation in portal hypertension due to cirrhosis of liver. *Indian J Gastroenterol* 20, 22-23.
- Stetler-Stevenson, W. G. (1999). Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *The Journal of clinical investigation* 103, 1237-1241.
- Stumpff, J., Du, Y., English, C. A., Maliga, Z., Wagenbach, M., Asbury, C. L., Wordeman, L., and Ohi, R. (2011). A tethering mechanism controls the processivity and kinetochore-microtubule plus-end enrichment of the kinesin-8 Kif18A. *Molecular cell* 43, 764-775.
- Sun, X. D., Shi, X. J., Sun, X. O., Luo, Y. G., Wu, X. J., Yao, C. F., Yu, H. Y., Li, D. W., Liu, M., and Zhou, J. (2011). Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion in vitro via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5. *Acta pharmacologica Sinica* 32, 1543-1548.
- Tanenbaum, M. E., Macurek, L., Janssen, A., Geers, E. F., Alvarez-Fernandez, M., and Medema, R. H. (2009). Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr Biol* 19, 1703-1711.
- Tanenbaum, M. E., Medema, R. H., and Akhmanova, A. (2011). Regulation of localization and activity of the microtubule depolymerase MCAK. *Bioarchitecture* 1, 80-87.
- Taniuchi, K., Nakagawa, H., Nakamura, T., Eguchi, H., Ohigashi, H., Ishikawa, O., Katagiri, T., and Nakamura, Y. (2005). Down-regulation of RAB6KIFL/KIF20A, a kinesin involved with membrane trafficking of discs large homologue 5, can attenuate growth of pancreatic cancer cell. *Cancer research* 65, 105-112.

- Tomasek, J. J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., and Brown, R. A. (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology* 3, 349-363.
- Tran, T. C., Sneed, B., Haider, J., Blavo, D., White, A., Aiyejorun, T., Baranowski, T. C., Rubinstein, A. L., Doan, T. N., Dingleline, R., and Sandberg, E. M. (2007). Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer research* 67, 11386-11392.
- Tuan, R. S. (1987). Mechanism and regulation of calcium transport by the chick embryonic chorioallantoic membrane. *J Exp Zool Suppl* 1, 1-13.
- Turner, J., Anderson, R., Guo, J., Beraud, C., Fletterick, R., and Sakowicz, R. (2001). Crystal structure of the mitotic spindle kinesin Eg5 reveals a novel conformation of the neck-linker. *The Journal of biological chemistry* 276, 25496-25502.
- Vale, R. D., Reese, T. S., and Sheetz, M. P. (1985). Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. *Cell* 42, 39-50.
- Valensin, S., Ghiron, C., Lamanna, C., Kremer, A., Rossi, M., Ferruzzi, P., Nievo, M., and Bakker, A. (2009). KIF11 inhibition for glioblastoma treatment: reason to hope or a struggle with the brain? *BMC cancer* 9, 196.
- Valter, M. M., Wiestler, O. D., and Pietsche, T. (1999). Differential control of VEGF synthesis and secretion in human glioma cells by IL-1 and EGF. *Int J Dev Neurosci* 17, 565-577.
- van Houwelingen, K. P., van Dijk, B. A., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., Schouten, L. J., Gorissen, H. J., Schalken, J. A., van den Brandt, P. A., and Oosterwijk, E. (2005). Prevalence of von Hippel-Lindau gene mutations in sporadic renal cell carcinoma: results from The Netherlands cohort study. *BMC cancer* 5, 57.
- Vanneste, D., Takagi, M., Imamoto, N., and Vernos, I. (2009). The role of Hklp2 in the stabilization and maintenance of spindle bipolarity. *Curr Biol* 19, 1712-1717.
- Veikkola, T., and Alitalo, K. (1999). VEGFs, receptors and angiogenesis. *Seminars in cancer biology* 9, 211-220.
- Vijapurkar, U., Wang, W. and Herbst, R. (2007). Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways. *Cancer Resarch* 67:237-245.
- Vlodavsky, I., and Goldshmidt, O. (2001). Properties and function of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Haemostasis* 31 Suppl 1, 60-63.
- Vokes, S. A., Yatskievych, T. A., Heimark, R. L., McMahon, J., McMahon, A. P., Antin, P. B., and Krieg, P. A. (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development (Cambridge, England)* 131, 4371-4380.
- Vredenburgh, J. J., Desjardins, A., Herndon, J. E., 2nd, Marcelllo, J., Reardon, D. A., Quinn, J. A., Rich, J. N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Sampson, J., et al. (2007). Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 25, 4722-4729.
- Waitzman, J. S., Larson, A. G., Cochran, J. C., Naber, N., Cooke, R., Jon Kull, F., Pate, E., and Rice, S. E. (2011). The loop 5 element structurally and kinetically coordinates dimers of the human kinesin-5, Eg5. *Biophysical journal* 101, 2760-2769.

- Walczak, C. E., Vernos, I., Mitchison, T. J., Karsenti, E., and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol* 8, 903-913.
- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93, 2325-2327.
- Weaver, B. A., Bonday, Z. Q., Putkey, F. R., Kops, G. J., Silk, A. D., and Cleveland, D. W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *The Journal of cell biology* 162, 551-563.
- Whitehead, C. M., and Rattner, J. B. (1998). Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *Journal of cell science* 111 (Pt 17), 2551-2561.
- Wilting, J., Christ, B., and Weich, H. A. (1992). The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anatomy and embryology* 186, 251-257.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E., and Vernos, I. (2000). TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *The Journal of cell biology* 149, 1405-1418.
- Woehlke, G., and Schliwa, M. (2000). Walking on two heads: the many talents of kinesin. *Nature reviews Molecular cell biology* 1, 50-58.
- Wordeman, L., Wagenbach, M., and von Dassow, G. (2007). MCAK facilitates chromosome movement by promoting kinetochore microtubule turnover. *The Journal of cell biology* 179, 869-879.
- Wu, G., Zhou, L., Khidr, L., Guo, X. E., Kim, W., Lee, Y. M., Krasieva, T., and Chen, P. L. (2008). A novel role of the chromokinesin Kif4A in DNA damage response. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7, 2013-2020.
- Xie, P. (2010). Mechanism of processive movement of monomeric and dimeric kinesin molecules. *International journal of biological sciences* 6, 665-674.
- Xin, H., Zhang, C., Herrmann, A., Du, Y., Figlin, R., and Yu, H. (2009). Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer research* 69, 2506-2513.
- Yan, G. R., Zou, F. Y., Dang, B. L., Zhang, Y., Yu, G., Liu, X., and He, Q. Y. (2012). Genistein-induced mitotic arrest of gastric cancer cells by downregulating KIF20A, a proteomics study. *Proteomics* 12, 2391-2399.
- Yang, J. T., Laymon, R. A., and Goldstein, L. S. (1989). A three-domain structure of kinesin heavy chain revealed by DNA sequence and microtubule binding analyses. *Cell* 56, 879-889.
- Yoon, S. Y., Choi, J. E., Huh, J. W., Hwang, O., Lee, H. S., Hong, H. N., and Kim, D. (2005). Monastrol, a selective inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, induces a distinctive growth profile of dendrites and axons in primary cortical neuron cultures. *Cell motility and the cytoskeleton* 60, 181-190.
- Zagzag, D., Lukyanov, Y., Lan, L., Ali, M. A., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Voura, E. B., and Newcomb, E. W. (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86, 1221-1232.

Zagzag, D., Zhong, H., Scalzitti, J. M., Laughner, E., Simons, J. W., and Semenza, G. L. (2000). Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* 88, 2606-2618.

Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J. D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J. B., Abraham, R. T., and Jiang, W. (2005). Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference. *Molecular biology of the cell* 16, 3187-3199.

Zhu, W. H., Iurlaro, M., MacIntyre, A., Fogel, E., and Nicosia, R. F. (2003). The mouse aorta model: influence of genetic background and aging on bFGF- and VEGF-induced angiogenic sprouting. *Angiogenesis* 6, 193-199.

Annexe 1

Kinesin KIF11/Eg5 plays a critical role in physiological and pathological angiogenesis in chick and zebrafish embryos and murine tumor models

Prisca Exertier^{1,2}, Sophie Javerzat^{1,2}, Baigang Wang^{3,8}, Mélanie Franco^{1,2}, John Herbert⁴, Natalia Platonova^{1,2}, Marie Winandy⁵, Olivier Nivelles⁶, Sandra Ormenese⁷, Virginie Godard^{1,2}, Jürgen Becker⁸, Roy Bicknell⁴, Raphael Pineau⁹, Jörg Wilting^{8*}, Andreas Bikfalvi^{1,2*}, Martin Hagedorn^{1,2*}

¹Univ. Bordeaux, LAMC, UMR 1029, F-33405 Talence, France

²INSERM, LAMC, UMR 1029, F-33405 Talence, France

³Ruhr-Universität Bochum, Medizinische Fakultät; Abt. f. Anatomie und Embryologie, D-44780 Bochum, Germany

⁴Molecular Angiogenesis Group, Institute of Biomedical Research, Univ Birmingham, Medical School, Edgbaston, Birmingham, UK

⁵GIGA, Zebrafish Facility, Tour B34, Université de Liège, Belgium

⁶GIGA, Unité de Biologie Moléculaire et Génie Génétique, Tour B34, Université de Liège, Belgium

⁷GIGA, Imaging and Flow Cytometry Facility, Tour B34, Université de Liege, Belgium

⁸Zentrum Anatomie, Abteilung Anatomie und Zellbiologie, Georg-August-Universität Göttingen, Germany

⁹Animalerie mutualisée, University of Bordeaux I, Talence, France

*Co-PIs, correspondence to MH (m.hagedorn@angio.u-bordeaux1.fr)

Running title: Kinesins in angiogenesis

Abstract word count: 155

Text word count (from “Introduction” to the end of “Discussion”): 4988

Numbers of figures: 6

Numbers of tables: 1

References: 50

Abstract

Kinesin motor proteins exert essential cellular functions in all eukaryotes. They control mitosis, migration and intracellular transport through interaction with microtubules. Small molecule inhibitors of the mitotic kinesin KIF11/Eg5 are a promising new class of anti-neoplastic agents currently evaluated in clinical cancer trials for solid tumors and hematological malignancies. Here we report induction of Eg5 and four other mitotic kinesins including KIF20A/Mklp2 upon stimulation of *in vivo* angiogenesis with vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A). Expression analyses indicate up-regulation of several kinesin-encoding genes predominantly in lymphoblasts and endothelial cells. Chemical blockade of Eg5 inhibits endothelial cell proliferation *in vitro*. Mitosis-independent endothelial tube formation is strongly impaired after Eg5 or Mklp2 protein inhibition. *In vivo*, interfering with KIF11/Eg5 function causes developmental and vascular defects in zebrafish and chick embryos and potent inhibition of tumor angiogenesis in experimental tumor models. Besides blocking tumor cell proliferation, impairing endothelial function is a novel mechanism of action of kinesin inhibitors.

Introduction

The ability of solid tumors to attract blood vessels (tumor angiogenesis) is one of the rate-limiting steps for tumor progression¹. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) is a key hypoxia-induced angiogenic protein secreted by tumor cells acting on the endothelium to induce and sustain new blood vessel growth². Neutralizing VEGF-A with drugs such as the humanized anti-VEGF-A antibody bevacizumab (Avastin) potently blocks tumor growth in numerous animal models. Associated with standard chemotherapy, bevacizumab is used worldwide against multiple cancer types and allows prolonged or progression-free survival. However, by far not all patients respond to anti-VEGF therapy and severe side effects such as hypertension and proteinuria have been reported, a fact which has led to the retirement of bevacizumab as a treatment for metastatic breast cancer³. It is therefore a challenge to explore the molecular networks that regulate blood vessel growth to identify novel druggable targets.

To discover novel downstream effectors of VEGF-A activity in the endothelium *in vivo*, we monitored global gene expression changes after application of recombinant human VEGF-A on the differentiated day-13 chick chorio-allantoic membrane (CAM)⁴. Numerous known genes associated with angiogenesis were up regulated by VEGF-A. Among the new ones, KIF4A, KIF11/Eg5, KIF15, KIF20A/Mklp2 and KIF23, all genes encoding mitotic kinesins, were consistently up-regulated. Using specific chemical inhibitors against Eg5 and Mklp2 proteins and KIF11 gene knock-down, we established a role of mitotic kinesins in the angiogenic process.

Kinesins belong to a family of about 45 proteins in humans; at least 12 of them are implicated in mitosis⁵. Mitotic kinesins interact with the mitotic spindle, organize its bipolar structure and are essential for proper segregation of chromosomes⁶. Kinesins bind microtubules and carry cargo within a cell. They use ATP to convert chemical energy into motile forces⁷. KIF11 encodes the Eg5 protein, which is essential for cell division⁸. Murine *Knsl1* (KIF11) null-embryos die prior to implantation between morula and blastocyst stage^{9,10}.

KIF20A/Mklp2 exerts important functions during mitosis by ensuring cleavage furrow formation and cytokinesis¹¹.

The first Eg5 inhibitor, Monastrol, was discovered during a phenotype-based chemical compound screening¹². The Monastrol derivative dimethylenastron¹³ shows 100-times higher inhibitory activity against Eg5. Ispinesib is a highly specific, quinazolinone allosteric inhibitor of Eg5. It is an ATP-non-competitive, but microtubule-competitive inhibitor, which binds to a site close to the nucleotide-binding pocket in a similar manner as monastrol¹⁴. Just recently, a specific chemical Mklp2-inhibitor termed paprotrain has been designed¹⁵.

First evidence that kinesin inhibition might be explored as a new anti-cancer strategy came in 2004¹⁶ and chemical inhibitors of Eg5 have been designed and tested with success against solid tumors in preclinical tumor models¹⁷. Consequently, there are an increasing number of clinical trials, which investigate efficacy of Eg5 inhibitors alone or associated with classical chemotherapy in hematological and solid malignancies (www.clinicaltrials.gov). There is a general consent that inhibitors of the mitotic kinesins, especially Eg5, have the potential to overcome side-effects associated with classical microtubule targeting agents such as Taxol, which include neutropenia, hair loss and peripheral neuropathy as well as resistance, thereby often limiting their usability^{5,18}.

Mitotic kinesins have been studied in the context of cell division almost exclusively in tumor cells. Beside their role in mitosis, an increasing number of reports point to the possibility that they may exert other biological functions. KIF11/Eg5 plays an important role in neuronal migration¹⁹ and in cell migration in the absence of myosin IIa²⁰. Only recently, an important role of Eg5 in protein translation has been discovered²¹ and KIF4A has been shown to be implicated in neuronal survival²². Since KIF11/Eg5 and KIF20A/Mklp2 are promising drug targets, we sought to investigate the mechanism of action of their respective inhibitors in angiogenesis, a process that is central to tumor progression.

Material and Methods

Detailed protocols are in the supplemental data section.

Identification of genes regulated by VEGF-A on the CAM

Chick embryos were handled as described²³. RNA was extracted from three CAMs treated each with 3µg of recombinant human VEGF-A and compared individually to pooled equivalent quantities of RNA from three normal CAMs (controls). Affymetrix chicken microarrays were processed in the Microarray Core Facility of the Institute of Research on Biotherapy, as published²⁴.

Bioinformatic analysis of microarray data

To extract biological themes associated with VEGF-A-induced genes, we used Gene Ontology through the DAVID interface (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)^{25,26}.

To focus on human ortholog genes with preferential expression in the endothelium, we analyzed the 317 genes by a recently developed, validated approach^{24,27}. In brief, genes were submitted to an automated BLAST pipeline to assign orthologs. Only orthologs were then compared to endothelial and non-endothelial expressed sequence tags (ETS) pools, followed by FDR-based statistics. The ratio of the number of corresponding ESTs gives an estimate of EC or non-EC specificity. In a similar manner, all kinesins identifiable by a KIFxx gene symbol were analyzed by this method and EC or non-EC enrichment was assigned. For expression and co-regulation studies in human tumors, Oncomine™ (Compendia Bioscience, Ann Arbor, MI) was used for analysis and visualization.

Semi-quantitative PCR

To verify microarray data, semi-quantitative PCR was performed on the same material used for microarray hybridization using efficient primers against VEGFR1, VEGFR2, KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23, normalized to HNRPH1 and RAB9A, which show no changes during normal CAM development²⁴.

Chemical inhibitors

Indirubin-3'-monoxime (IRO, CDK/GSK-3 β inhibitor)²⁸ was purchased from Sigma, dimethylenastron (DMN, Eg5 inhibitor) was from Sigma or Chemstep Molexplorer (Martillac, France), ispinesib mesylate (ISP, Eg5 inhibitor) was from Selleck Chemicals (Houston, Tx, USA), (Z)-2-(1H-indol-3-yl)-3-(pyridin-3-yl)acrylonitrile (paprotrain = PAssenger PROteins TRANsport Inhibitor, MKLP2 inhibitor)¹⁵ was synthesized by Chemstep Molexplorer.

Cell culture and proliferation assays

hCMEC/D3 cells²⁹ were a kind gift of Dr. P. O. Couraud (Institut Cochin, Paris) and cultured as described²⁴. Vascular endothelial cells (HUVECs, BAEs), lymphatic endothelial cells (LECs), fibroblasts (Fibro) and tumor cell lines (U87, T98G, GL261, CHP134, GIMEN, Kelly, IMR5 and SHEP) were cultured using routine cell culture conditions.

Tubulogenesis assays

4000 HUVECs were placed in μ -slide angiogenesis tissue culture plates coated with growth factor-reduced Matrigel (Ibidi, Biovalley, France) and covered with medium containing solvent or different inhibitors. After 14h, photos were taken at 4-fold magnification using an inverted light microscope. Digital images were uploaded to the WIMASIS image analysis

platform and analyzed in an automated fashion (<http://wimasis.com>). The parameters “number of tubes”, “number of loops”, “isolated tubes” and “branching points” were determined from two independent experiments and compared using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn’s post-test. For videomicroscopy, cultures were placed at controlled cell culture conditions under a motorized Nikon Ti-E Inverted MEA53100 Microscope coupled to a Hamamatsu ORCA-R2 camera and photos were taken every ten minutes over a 14h time period.

Cell adhesion, spreading and migration

Adhesion, spreading and migration assays were performed with HUVECs using standard protocols (see supplemental methods).

Chemical inhibition of Eg5 in chick embryos

Chick embryos were injected with 3 μ l of dimethylenastron (1 μ g/ μ l) at Hamburger & Hamilton (HH) stage 21 (3.5 days) into the allantoic vesicle (n=20 embryos). Control embryos (n=15) received equal volume of solvent (DMSO). Embryos were examined under a biomicroscope the following day at stage HH24.

Zebrafish experiments

All zebrafish experiments were carried out using standard procedures (described in supplemental material and methods). In brief, Tg(flk1:EGFP) embryos³⁰ were microinjected at the 1-2 cell stage with 0.2-1 ng KIF11 morpholino (Gene Tools, USA). Higher doses were lethal and did not allow further analysis. At 48 hours post-fertilization (hpf), embryos were phenotype-scored and photographed.

For chemical Eg5 inhibition, normal zebrafish embryos were treated with indicated doses of ispinesib at 24 hpf and phenotype-scored at 48 hpf.

Experimental tumor models

U87 glioma cells were implanted on the CAM as described³¹ and treated once or twice daily with DMN or ISP, at indicated doses. Control tumors received solvent (DMSO). Tumors were photographed *in vivo* and blind-scored by seven investigators familiar with the model for degree of vascularization³², and processed for histology. The orthotopic renal cell carcinoma model is detailed in the supplemental data section.

Histology, immunohistology and fluorescence *in situ* hybridization

Unfixed human foreskin from healthy donors was used for Eg5 (polyclonal rabbit anti-human, Abcam ab37009) co-localization studies with lymphatic (mouse-anti-human podoplanin, ReliaTech, Germany) and vascular endothelium (mouse anti human CD31; BD clone WM59). For analysis of experimental glioma, anti-vimentin (clone V9, Neomarkers) was used. Chick blood vessels were stained with *sambucus nigra* lectin (SNA, Vector Labs), and nuclei counterstained with DAPI. For *in situ* hybridization, fluorescent zebrafish probes KIF11 and FLI1 were used on whole embryos. Human tumor sections were analyzed for Eg5 expression by standard immunohistochemistry (www.proteinatlas.org) and for KIF20A expression using QuantiViewRNA hybridization (Panomics-Affymetrix), details are in the supplemental methods section.

Results

VEGF-A-induced gene expression *in vivo*

Human recombinant VEGF-A induces growth of new capillaries inside the CAM within 24h (Fig. 1a-c). They are not a re-arrangement of existing CAM capillaries, but constitute true angiogenic blood vessels⁴. Chicken microarray analyses of angiogenic areas of three individual CAMs were performed. 317 probes showed significantly increased expression (more than 2-fold in at least two out of three comparisons; Table S1). Fold-changes of all significantly induced genes in VEGF-A-stimulated CAMs showed strong correlation (Spearman R ranging from 0.7 to 0.78, $p < 0.0001$ in all cases; Fig. 1d).

An automated reciprocal blast search identified human orthologs of the 317 chick genes and an *in silico* prediction of endothelial vs. non-endothelial expression of these revealed those with expression enriched in endothelium^{24,27}. 206 human ortholog genes were identified and submitted to gene ontology (GO) using the DAVID interface²⁵ (Table S2). Interestingly, GO terms associated with mitosis were highly significantly enriched (11.6-fold, FDR: 7.44×10^{-13}). Another annotation cluster identified GO term “blood vessel development” (enrichment 5.5-fold, FDR 1.66×10^{-4}). A total of 53 single genes with human orthologs and preferential endothelial expression (q-value > 0.5) were identified (Table 1). This list contained numerous key angiogenic regulators with known endothelial expression, such as TEK, CD34, CDH5, SOX18, PECAM1, KDR, FLI1, PRCP and LMO2. These results show that relevant biological material was isolated for microarray analysis.

One of the genes with highest up-regulation and specific prediction of endothelial cell over-expression was KIF11 (Eg5 protein). A PubMed query revealed no published association of kinesins and the angiogenic process. We therefore focused our work on kinesin family members induced by VEGF-A. Amongst the genes associated with mitosis, we found several kinesins, including KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23. We also included KIF4A in our

further analysis, because it showed consistent regulation in all three CAMs, just below the threshold of 2-fold change. Up-regulation of the five kinesins by VEGF-A was confirmed by semi-quantitative qPCR and was 4.64 (4.79) for KIF4A, 3.68 (3.8) for KIF11, 6.06 (6.25) for KIF15, 5.41 (5.58) for KIF20A and 2.85 (2.95) for KIF23 using two different normalizer genes, RAB9A and HNRPH1 (in parentheses). Increased production of Eg5 protein was further confirmed *in vitro*, after stimulating HUVECs with VEGF₁₆₅ protein. Increase in Eg5 protein could be abolished by simultaneous application of the neutralizing anti-VEGF antibody Avastin (Fig. S1).

Kinesin expression and localization

To get a more detailed picture of kinesin gene expression in endothelial vs. non-endothelial cells, we performed *in silico* bioinformatic screen²⁷ on all genes encoding kinesins. Eight out of 38 kinesin transcripts showed enrichment in the endothelial EST pool more than two-fold, including the VEGF-A-induced kinesins KIF11, KIF15 and KIF20A (Table S3).

In freshly isolated human foreskin, Eg5 staining overlapped to a great extent with that of CD31, indicating that blood endothelial cells strongly express Eg5 protein (Fig. 2a). Lymphatic vessels identified by podoplanin immunoreactivity were also Eg5 positive (Fig. 2b). High expression of Eg5 in blood endothelial cells was also paralleled on the transcript level using real-time RT-PCR. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) contained 10 to 15-fold more KIF11 mRNA compared to human lymphatic endothelial cells (LECs) or fibroblasts (Fibro, Fig. 2c).

In cancer tissues, Oncomine expression analysis showed significant ($P < 0.0001$) over-expression in glioblastoma samples compared to normal brain. Expression levels for KIF11 and KIF20A were three-fold and 18.6-fold higher (Fig. S2b), over-expression of KIF4A, KIF15 and KIF23 were 9.2-fold, 2.8-fold and 2.8-fold, respectively ($p < 0.0001$ for all). Immunohistological analysis of human glioblastoma samples revealed strong staining of Eg5

in endothelial and tumor cells (Fig. 2d). Similar results were obtained in renal cell carcinoma (Fig. 2e). Mklp2/KIF20A protein showed an even stronger expression in endothelial cells in several normal tissues (heart, placenta, endometrium, oral mucosa; Fig. S3a-d) and glioblastoma vessels (Fig. S3e, f). KIF20A transcripts were found mostly in ECs in glioblastoma (n=4 patients, arrows; Fig. S3h), matching the vascular localization of CD31 (Fig. S3g).

Over-expression of VEGF-A-induced kinesins is a common phenomenon in a wide variety of human malignancies. Oncomine expression analysis showed significantly elevated transcripts of all five kinesins in sarcoma, CNS, bladder and lung cancer, amongst others (Fig. S2a). To investigate whether the five kinesins may be part of a gene signature of functionally connected genes, we performed co-expression analysis using KIF11 gene as bait (Fig. S4a). Expression was low in normal brain, but elevated in anaplastic oligodendroglioma (French_brain study) and all five kinesins were highly co-expressed (correlation from 0.903 for KIF4A to 0.872 for KIF15; black arrows). Similar co-expression could be evidenced in a glioblastoma study (Freje_brain study; Fig. S4b). In sarcoma, these five kinesins are part of a 67-gene signature, which predicts poor clinical outcome³³. Co-expression could be linked to other pathological features such as the vascularization state of a tumor, as evidenced in the Wurmbach_liver study for hepatocellular carcinoma: KIF11, KIF4A and KIF15 were strongly co-expressed with KIF20A (>0.8; Fig. S5) and expression levels increased with the degree of vascularization and were highest in tumors with macroscopic vascular invasion.

We also used data provided by the BioGPS project³⁴ to compare KIF11 and KIF20A expression in 84 human tissues and cell lines. Only 8 cell lines had relative KIF11 mRNA levels higher than 20 (Fig. S6), highest levels were found in 721_B_lymphoblasts (274.8), followed by other lymphoblastic lines and CD105+ and CD34+ endothelial cells (167.95 and 64.75). Highly comparable data were found for KIF20A, relative expression values of KIF11 and KIF20A were highly correlated (Spearman $r=0.8492$, $P<0.0001$).

Eg5 blockade inhibits proliferation of endothelial cells and tumor cell lines

We next undertook a systematic analysis to assess the sensitivity of different endothelial and tumor cells to Eg5 inhibition using the specific inhibitor dimethylenastron (DMN)¹³. Even though HUVEVCs contain more KIF11 transcripts compared to LECs, growth of HUVECs and LECs was inhibited by DMN in a dose- and time-dependent manner (Fig. 3a, b, c). Inhibition became evident after 72h of treatment with first effects at 0.5 μ M and maximal effects at 1 μ M. Significant growth inhibition at doses from 0.5 to 1 μ M was also observed in an immortalized human brain microcapillary endothelial cell line hCMEC/D3²⁹ (Fig. 3d), the human glioma cell lines U87 and T98G (Fig. 3e, f), five neuroblastoma cell lines (Fig. 3g) and the murine glioblastoma cell line GL261 (Fig. 3h).

To verify whether cell proliferation selectively induced by a defined growth factor could be inhibited by DMN, we stimulated bovine aortic endothelial cells (BAE) with VEGF-A or FGF-2 in reduced growth medium. Eg5 blockade at 1 μ M led to complete growth inhibition after 72h, regardless of the type of mitogen used (Fig. 3i).

To investigate whether apoptosis is also induced by Eg5 inhibition³⁵ in endothelial cells, we treated HUVECs with ispinesib and found significant increase in caspase 3/7 activity, similar to the levels achieved with staurosporin (Fig. 3j).

KIF11/Eg5 and KIF20A/Mklp2 inhibition interferes with endothelial tube formation in absence of mitosis

Indirubin-3'-monoxime (IRO)²⁸, which has been shown to inhibit angiogenesis in zebrafish embryos as well as tube formation, was used as positive control for evaluating the results with the automated blinded WIMASIS tube formation analysis platform. IRO treatment significantly reduced the number of branching points (45.4% of controls, P=0.0003), increased the number of independent (fragmented) tubes (215.2% over controls, P=0.0004) and reduced loop formation (30.9% of controls, P=0.0077). We verified whether cell proliferation occurs during the time of tube formation using BrDU incorporation and found that mitosis is a very rare occurrence in our assay conditions (Fig. S7).

Strong perturbation of the tube formation process was observed after Eg5 blockade using two specific inhibitors, dimethylenastron (DMN; Fig. 4b) and ispinesib (ISP; Fig. 4c and Video 1), whereas solvent-treated cultures were not affected (Fig 4a and Video 2). Inhibition was observed with ispinesib at both doses (5 and 10 μ M). Number of tubes was reduced by 2-fold, branching points by nearly 90%, independent tubes increased 3-times and number of loops was reduced by 90% (Fig. 4e-h). Less potent inhibition was observed with the Eg5 inhibitor DMN (Fig. 4e-h). Chemical blockade of Mklp2/KIF20A protein using paprotrain also inhibited tube formation (Fig. 4d), albeit at higher doses (20 μ M) and to a lesser extent than the KIF11/Eg5 inhibitors (Fig. 4e-h).

Kinesin inhibition affects endothelial cell adhesion, spreading and migration

Tube formation requires cell adhesion and migration. Eg5 function is required for proper cell adhesion of HUVECs plated on different matrix proteins. Ispinesib-treated cells (5 μ M) adhered poorly and detached after washing prior to Coomassie staining (Fig. S8a). Cells appeared more rounded and phalloidin staining revealed an altered organization of the actin

cytoskeleton, with an appearance of cortical actin and strong reduction of stress fibers (Fig. S8b). Quantification of the number of spreading cells revealed a significant decrease after Eg5 blockade using ispinesib ($p < 0.0001$, Fig. S8c). Endothelial cell migration was measured over an 18h time period. Migrating HUVECs in serum and DMSO control wounds covered around 90% of the denuded area (Fig. S9a, b), whereas Ispinesib-treated cultures were covered by 36% and paprotrain cultures only by 28% ($p < 0.0001$).

KIF11/Eg5 is required for CAM development and physiological hematopoiesis and angiogenesis in zebrafish

We tested whether Eg5 inhibition would perturb development of the highly vascularized chorio-allantoic membrane (CAM) of chick embryos. When DMN was injected into the allantoic vesicle at Hamburger&Hamilton stage 21 (HH21) embryos, expansion of the vesicle was completely inhibited as evidenced by biomicroscopic analysis one day later (HH24; Fig 5b, c). Only a rudimentary tissue mass with a primitive vascular network developed. This effect was consistent in all DMN-injected embryos, control embryos showed normal growth of the allantoic vesicle (arrows, Fig. 5a).

Eg5 inhibition was also performed in normal zebrafish embryos from 24 to 48hpf using increasing doses of ISP (Fig. 5d). Embryonic lethality was only observed in the ISP treatment groups, ranging from 8% at 0.1 μ M, up to 18% at 1 μ M. Analysis of live embryos revealed changes in the morphology of the posterior blood islands (PBI) as well as a reduction of circulating blood cells. This phenotype did not occur in control embryos, but up to 15% of embryos displayed these modifications at 1 μ M ($P=0.0067$) and 3 μ M ($P=0.0041$), suggesting that the developing hematopoietic system is sensitive to Eg5 inhibition.

We therefore examined expression of KIF11 in 24hpf embryos; a time point where a transient wave of hematopoiesis takes place in the PBI and circulation begins³⁶. A probe against the ETS-domain transcription factor FLI1 was used to visualize cellular components of the developing blood vascular system, including the PBI. The KIF11 probe labeled various cellular components of the embryo with different intensities; strong staining was evident in the PBI and PCV (posterior cardinal vein), where a partial co-localisation with the FLI1 signal was observed (Fig. S10a).

Morpholino-mediated knock down of the KIF11 gene in the transgenic Tg(kdr:EGFP) line had severe effects on embryonic morphology and survival (Fig. 5e). Whereas almost all

control morpholino embryos developed normally, the number of dead and affected embryos increased even at the low morpholino dose of 0.2 ng ($P < 0.005$; 0.2 ng vs. controls). At 0.5 ng, effects were even more severe and 70% of embryos were dead. We therefore focused on the embryos treated with the lower dose. Embryos appeared curved and severe phenotypes had pericardial edema (Fig. 5f, arrow). Various morphological defects occurred in the developing vasculature, ranging from shortened inter-somitic vessel (ISV) sprouts (Fig. 5g; first two arrows), discontinuity of the dorsal longitudinal anastomotic vessel (DLAV) (asterisk, mild phenotype) and hyper-branching (third arrow). Embryos with severe phenotypes had complete absence of the DLAV and shortened and distorted ISV sprouts (arrows; more examples are shown in Fig. S10b).

These results – together with the high expression levels of KIF11 in hematopoietic and endothelial cells – suggest that Eg5/KIF11 might be a novel target for anti-angiogenic therapy in pathological settings.

Interfering with KIF11/Eg5 function reduces tumor angiogenesis

There are increasing numbers of clinical studies evaluating the efficacy of kinesin inhibitors against cancer. It is therefore of interest to investigate how kinesin inhibition affects the tumor microenvironment at a cellular level. Experimental gliomas grown on the chicken CAM are accessible to topical treatment with chemical tyrosine kinase inhibitors such as imatinib mesylate or PTK787³¹. Tumors were size-matched and treated with the two different Eg5 inhibitors DMN and ISP (Fig. 6a-d). During the three-day treatment period, no measurable tumor size reduction occurred. However, biomicroscopic observation of the tumors at day 4 showed increasing whitish areas at the tumor surface corresponding to necrosis as confirmed by subsequent histology. Immunohistological analysis of the tumors showed reduced numbers of angiogenic capillaries after treatment with a single dose of DMN per day (Fig. 6f). This effect was much stronger after two DMN doses; the tumors were almost completely devoid of

blood vessels, whereas tumor cells apart from the necrotic areas appeared normal (Fig. 6g). Tumor cell morphology evidenced by vimentin staining was not altered by DMN treatment, even at the highest doses. Two treatments of ispinesib caused widespread destruction of cellular components of the tumor as evidenced by non-specific staining of dead cells for *sambucus nigra* agglutinin (SNA lectin), clearly visible below the surface (Fig. 6h). Tumor angiogenesis can be evidenced by visual inspection and subsequent categorization of the tumors in a blinded fashion³². A significantly higher number of ispinesib-treated tumors were found in the poorly vascularized group ($P < 0.005$) and accordingly, only a small number of ispinesib-treated tumors were classified in the highly vascularized group ($P < 0.005$; Fig 6i). To monitor effects of Eg5 inhibition over a longer time period, we switched to a syngeneic mouse tumor model. RENCA cells implanted orthotopically in kidneys give rise to highly aggressive and fast growing tumors with tumor weights up to 4 g after a 3-weeks time period (median 1.9 g; Fig. 6j, k). Twice-weekly treatment with ispinesib potently reduces tumor weight (median 796 mg; $P = 0.0033$) and tumor angiogenesis ($P = 0.0025$; Fig. 6l, m). Taken together, these results suggest that Eg5 inhibition leads to a reduction of tumor angiogenesis in a short-term model where higher doses might be needed to affect tumor cells directly, and that prolonged treatment also leads to a reduction of tumor growth, directly or indirectly by inhibiting tumor angiogenesis.

Discussion

It is widely accepted that the secreted growth factor VEGF-A and its transmembrane receptors, are key regulators of embryonic and pathologic angiogenesis². Anti-VEGF-A therapies are applied with great success in age-related macular degeneration, a progressive angioproliferative disease and the third major cause of blindness worldwide³⁷. The angiogenic switch is a key event during tumor progression¹ and there has been much hope that anti-VEGF-A therapies may inhibit tumor growth significantly. Here, however, anti-VEGF strategies have their limitations, due to a limited number of therapy responders, severe side effects of the VEGF-targeting antibody Avastin and raising concerns about the high costs of such treatment³. However, VEGF-A is a major proangiogenic factor *in vivo*, and therefore, it is of crucial importance to identify new druggable targets, which are associated with its downstream functions.

We chose the chick embryonic day-13 chorio-allantoic membrane (CAM), since human VEGF-A specifically induces angiogenesis in this tissue⁴. We compared the transcriptome of CAMs stimulated 24h with VEGF-A and control CAMs. A global analysis of regulated angiogenesis genes *in vivo* is more reliable than *in vitro* transcriptome analysis of angiogenic endothelial cells, since major molecular differences have been found when endothelial cells are studied separated from their normal tissue context^{38,39}.

We observed significant and reproducible up-regulation of approximately 300 genes. Many of them were expected candidates such as VEGFR-2, Tie2, CD34, CDH5, PECAM-1. The identification of these known genes shows that relevant biological samples have been isolated and supports the utility of the *in vivo* model.

Numerous genes up-regulated by VEGF-A have not yet been studied in the context of angiogenesis. Among these we found five members of the kinesin family of motor proteins: KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23. Since there are no reports about kinesin functions

in blood vessel formation, we investigated the effects of kinesin inhibition on the angiogenic process *in vitro* and *in vivo*, focusing on Eg5/KIF11 and Mklp2/KIF20A.

Our bioinformatics analysis and immunostaining results of normal human foreskin (Fig. 2) show that KIF11/Eg5 is strongly expressed in blood vascular ECs. Human foreskin ECs also express VEGFR-2, a marker of angiogenic capillaries⁴⁰. Only cells from the hematopoietic lineage (normal or neoplastic), together with CD³⁴⁺ and CD¹⁰⁵⁺ endothelial cells also displayed high levels of KIF11 and KIF20A kinesins (Fig. S6). An observation in line with these results is the strong expression of KIF11 in the posterior blood islands of zebrafish embryos. In addition, inhibition of Eg5 function by ispinesib in this model leads to modification of this structure or reduced number of blood cells. In humans, neutropenia is a frequent side effect of anti-kinesin therapy⁴¹, suggesting that Eg5 function is also required for generation and maintenance of immune cells.

Morpholino-mediated knock-down of KIF11 results in vascular pattern defects in the trunk vasculature (Figure 5 e-g, Fig. S10b). These results point to an important function of KIF11/Eg5 in the endothelial cell lineage. Besides endothelial cell proliferation, other biological processes such as tube formation also require Eg5 and Mklp2. Cell adhesion, spreading and migration that are critical for tube formation are strongly perturbed by Eg5 and Mklp2 inhibition (Figs. S8, S9). We observed a modification of the cytoskeleton in cells treated with ispinesib, with an increase of cortical actin and strong reduction of stress fibers. These changes in the cytoskeleton are most likely responsible for the reduced migratory and adhesive capacity after Eg5 inhibition. Just recently, it has been shown that Eg5 also influences neuronal cell migration¹⁹ and that DMN blocks pancreatic cancer cell migration and invasion⁴².

Interestingly, all five kinesins induced by VEGF-A are also present in the highly significant 67-gene signature termed CINSARC (complexity index in sarcomas), which is associated with poor clinical outcome in several cancer types³³. It is tempting to speculate that VEGF-A-

induced kinesins contributes to bad prognosis in human cancers or reflects the state of an activated tumor endothelium. Significant co-expression of these five kinesins has also been evidenced by bioinformatic analysis in various malignant tumors, especially in brain tumors (Fig. S4). In hepatocellular carcinoma (HCC), increasing kinesin (co-) expression is furthermore associated with the vascular status of the tumors (Fig. S5). Another group has just recently confirmed overexpression of KIF20A in HCC⁴³.

As expected, Eg5 inhibition stops glioblastoma cell growth⁴⁴. Eg5 inhibitors not only stop proliferation of adult tumor cell lines, but also those derived from childhood tumors. In all neuroblastoma cell lines we tested, proliferation was strongly reduced with 0.5 or 1 μ M DMN. Neuroblastoma is the most frequent extracranial solid tumor in children. It is derived from sympatho-adrenal neural crest cells and its prognosis is highly heterogenous, from spontaneous regression to fatal outcome. In the progressed stage 4 neuroblastoma, the 5-year survival rate is only 20 – 30%⁴⁵. High vascular density is characteristic for the progressed neuroblastomas⁴⁶.

In the light of our *in vitro* results on Eg5/KIF11 inhibition of endothelial cells, it can be expected that Eg5 inhibition might have a dual effect as it affects both malignant cells and tumor vasculature. Inhibition of tumor angiogenesis in the short-term experimental glioma model³¹ was the predominant effect observed, suggesting that the endothelium constitutes an important target for this inhibitor. Oncomine expression data show that KIF11/Eg5 is not overexpressed in kidney cancer, however, protein expression can be found in the vasculature of renal cell carcinoma and Eg5 inhibition significantly reduces experimental kidney cancer growth and angiogenesis. Thus, kinesin inhibitors may inhibit *in vivo* tumor growth through a combined effect on tumor cells and blood vessels, the vasculature being its primary target. This may open up new therapeutic perspectives such as targeting chemical inhibitors to the tumor endothelium and stroma⁴⁷ to enhance the therapeutic efficacy.

Furthermore, combination of small-molecule Eg5 inhibitors with anti-angiogenic agents may reduce side effects or increase the number of responders to anti-angiogenesis treatment. Eg5 blockade not only inhibits VEGF-A-induced cell proliferation, but also FGF-2 stimulated proliferation (and probably that of other endothelial growth factors) and thus has a more broad-range effect than specific VEGF inhibitors (Fig. 3i). It is therefore tempting to speculate that Eg5 inhibition might render endothelial cells refractory to growth stimuli secreted by tumor cells, thereby maintaining a potent anti-angiogenic environment.

If an important mode of action of kinesin inhibitors is impairing tumor angiogenesis, it might be worth trying to combine drugs such as ispinesib with classical chemotherapeutic agents to enhance anti-tumor activity. Even though single anti-angiogenic treatment works well in animal models, combination with standard chemotherapy is needed for most tumor types to obtain results in patients. A special emphasis should be given to the fact that cells from the hematopoietic lineage overexpress Eg5 (and Mklp2). First, patients suffering from these highly proliferative malignancies might benefit from kinesin inhibition due to its dual anti-proliferative and anti-angiogenic effect. Second, since a frequent side effect of Eg5 inhibitors is neutropenia, efforts should be made to develop specific cell and tumor targeting kinesin-inhibition strategies to avoid this side effect.

Evidence is emerging that over expression of KIF4A and KIF18A may play roles in tumor progression^{48,49}. Furthermore, knock-down of the KIF23 gene has been shown to abrogate glioma cell proliferation and tumor growth *in vivo*⁵⁰. This opens the perspective that other kinesins may serve as druggable targets for anti-cancer therapy.

Taken together, our results provide evidence that kinesins, which lay downstream of angiogenic growth factors signaling, mediate essential processes important for physiological and pathological vascular growth and may constitute a potential therapeutic target for anti-vascular tumor therapy.

Acknowledgments

This research was supported by the ANR (grant no. JCJC06060 to M.H.), ARC (grant no 1062 and SFI20111203975 to M.H.) and La Ligue Régionale Contre le Cancer, Comité Aquitaine-Charentes (to S.J.). N.P. was a postdoctoral fellowship recipient from INSERM. P.E. was supported by a grant from the Aquitaine region / INSERM and ARC (Association de la Recherche contre le Cancer). The University Hospital Bordeaux and Cancéropôle Grand Sud-Ouest tumor bank provided glioblastoma tumor samples for immunostaining.

Authorship Contributions and Disclosure of Conflicts of Interest

P.E. performed most *in vitro* assays, tumor xenograft assays (together with R.P.) and histological analysis. S.J., M.H., M.W., O.N. and S.O. performed the zebrafish experiments. B.W. and J.B. and J.W. performed *in vitro* proliferation studies, immunohistological stainings and *in vivo* experiments in chick embryos. M.H., N.P. and S.J. realized VEGF-induction experiments on the CAM. M.H., S.J. and J.H. carried out bioinformatics analysis including microarrays. V.G. and S.J. performed *in-situ* hybridization and expression studies. N.P. and M.F. performed quantitative real time-PCR and molecular cloning experiments. M.H. and J.W. designed the experiments and M.H. wrote the paper. K.C. synthesized chemical inhibitors. All authors read and discussed the paper. The authors declare no conflicts of interests.

References

1. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
2. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J*. 1999;13(1):9-22.
3. Tanne JH. FDA cancels approval for bevacizumab in advanced breast cancer. *BMJ*. 2011;343:d7684. Prepublished on 2011/11/29 as DOI 10.1136/bmj.d7684.
4. Wilting J, Christ B, Weich HA. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186(3):251-257.
5. Sarli V, Giannis A. Inhibitors of mitotic kinesins: next-generation antimetabolites. *ChemMedChem*. 2006;1(3):293-298.
6. Wittmann T, Hyman A, Desai A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat Cell Biol*. 2001;3(1):E28-34.
7. Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(10):682-696. Prepublished on 2009/09/24 as DOI nrm2774 [pii] 10.1038/nrm2774.
8. Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature*. 2004;432(7020):1036-1040. Prepublished on 2004/12/24 as DOI nature03159 [pii] 10.1038/nature03159.
9. Castillo A, Justice MJ. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(3):694-699.
10. Chauviere M, Kress C, Kress M. Disruption of the mitotic kinesin Eg5 gene (Kns11) results in early embryonic lethality. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;372(4):513-519.
11. Hill E, Clarke M, Barr FA. The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis. *EMBO J*. 2000;19(21):5711-5719. Prepublished on 2000/11/04 as DOI 10.1093/emboj/19.21.5711.
12. Mayer TU, Kapoor TM, Haggarty SJ, King RW, Schreiber SL, Mitchison TJ. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*. 1999;286(5441):971-974.
13. Gartner M, Sunder-Plassmann N, Seiler J, et al. Development and biological evaluation of potent and specific inhibitors of mitotic Kinesin Eg5. *Chembiochem*. 2005;6(7):1173-1177. Prepublished on 2005/05/25 as DOI 10.1002/cbic.200500005.
14. Lad L, Luo L, Carson JD, et al. Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry*. 2008;47(11):3576-3585. Prepublished on 2008/02/23 as DOI 10.1021/bi702061g.
15. Tcherniuk S, Skoufias DA, Labriere C, et al. Relocation of Aurora B and survivin from centromeres to the central spindle impaired by a kinesin-specific MKLP-2 inhibitor. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2010;49(44):8228-8231. Prepublished on 2010/09/22 as DOI 10.1002/anie.201003254.
16. Sakowicz R, Finer JT, Beraud C, et al. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Res*. 2004;64(9):3276-3280. Prepublished on 2004/05/06 as DOI.
17. Basso AD, Liu M, Dai C, et al. SCH 2047069, a novel oral kinesin spindle protein inhibitor, shows single-agent antitumor activity and enhances the efficacy of chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(11):2993-3002. Prepublished on 2010/10/28 as DOI 1535-7163.MCT-10-0548 [pii]

10.1158/1535-7163.MCT-10-0548.

18. Orr GA, Verdier-Pinard P, McDaid H, Horwitz SB. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*. 2003;22(47):7280-7295. Prepublished on 2003/10/25 as DOI 10.1038/sj.onc.1206934
1206934 [pii].
19. Falnikar A, Tole S, Baas PW. Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration. *Mol Biol Cell*. 2011. Prepublished on 2011/03/18 as DOI mbc.E10-11-0905 [pii]
10.1091/mbc.E10-11-0905.
20. Even-Ram S, Doyle AD, Conti MA, Matsumoto K, Adelstein RS, Yamada KM. Myosin IIA regulates cell motility and actomyosin-microtubule crosstalk. *Nat Cell Biol*. 2007;9(3):299-309. Prepublished on 2007/02/21 as DOI ncb1540 [pii]
10.1038/ncb1540.
21. Bartoli KM, Jakovljevic J, Woolford JL, Jr., Saunders WS. Kinesin Molecular Motor Eg5 Functions during Polypeptide Synthesis. *Mol Biol Cell*. 2011. Prepublished on 2011/07/29 as DOI mbc.E11-03-0211 [pii]
10.1091/mbc.E11-03-0211.
22. Midorikawa R, Takei Y, Hirokawa N. KIF4 motor regulates activity-dependent neuronal survival by suppressing PARP-1 enzymatic activity. *Cell*. 2006;125(2):371-383. Prepublished on 2006/04/25 as DOI S0092-8674(06)00373-4 [pii]
10.1016/j.cell.2006.02.039.
23. Hagedorn M, Balke M, Schmidt A, et al. VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn*. 2004;230(1):23-33. Prepublished on 2004/04/27 as DOI 10.1002/dvdy.20020.
24. Javerzat S, Franco M, Herbert J, et al. Correlating global gene regulation to angiogenesis in the developing chick extra-embryonic vascular system. *PLoS One*. 2009;4(11):e7856. Prepublished on 2009/11/20 as DOI 10.1371/journal.pone.0007856.
25. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
26. Dennis G, Jr., Sherman BT, Hosack DA, et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol*. 2003;4(5):P3.
27. Herbert JM, Stekel D, Sanderson S, Heath VL, Bicknell R. A novel method of differential gene expression analysis using multiple cDNA libraries applied to the identification of tumour endothelial genes. *BMC Genomics*. 2008;9:153. Prepublished on 2008/04/09 as DOI 1471-2164-9-153 [pii]
10.1186/1471-2164-9-153.
28. Tran TC, Sneed B, Haider J, et al. Automated, quantitative screening assay for antiangiogenic compounds using transgenic zebrafish. *Cancer Res*. 2007;67(23):11386-11392. Prepublished on 2007/12/07 as DOI 67/23/11386 [pii]
10.1158/0008-5472.CAN-07-3126.
29. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J*. 2005;19(13):1872-1874.
30. Jin SW, Beis D, Mitchell T, Chen JN, Stainier DY. Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish. *Development*. 2005;132(23):5199-5209. Prepublished on 2005/10/28 as DOI dev.02087 [pii]
10.1242/dev.02087.
31. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1643-1648.

32. Auf G, Jabouille A, Guerit S, et al. Inositol-requiring enzyme 1alpha is a key regulator of angiogenesis and invasion in malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(35):15553-15558. Prepublished on 2010/08/13 as DOI 0914072107 [pii] 10.1073/pnas.0914072107.
33. Chibon F, Lagarde P, Salas S, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nat Med*. 2010;16(7):781-787. Prepublished on 2010/06/29 as DOI nm.2174 [pii] 10.1038/nm.2174.
34. Wu C, Orozco C, Boyer J, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. 2009;10(11):R130. Prepublished on 2009/11/19 as DOI gb-2009-10-11-r130 [pii] 10.1186/gb-2009-10-11-r130.
35. Marcus AI, Peters U, Thomas SL, et al. Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. *J Biol Chem*. 2005;280(12):11569-11577. Prepublished on 2005/01/18 as DOI M413471200 [pii] 10.1074/jbc.M413471200.
36. Chen AT, Zon LI. Zebrafish blood stem cells. *J Cell Biochem*. 2009;108(1):35-42. Prepublished on 2009/07/01 as DOI 10.1002/jcb.22251.
37. Mousa SA, Mousa SS. Current status of vascular endothelial growth factor inhibition in age-related macular degeneration. *BioDrugs*. 2010;24(3):183-194. Prepublished on 2010/03/10 as DOI 10.2165/11318550-000000000-00000.
38. Wick N, Saharinen P, Saharinen J, et al. Transcriptomal comparison of human dermal lymphatic endothelial cells ex vivo and in vitro. *Physiol Genomics*. 2007;28(2):179-192. Prepublished on 2007/01/20 as DOI 10.1152/physiolgenomics.00037.2006.
39. Amatschek S, Kriehuber E, Bauer W, et al. Blood and lymphatic endothelial cell-specific differentiation programs are stringently controlled by the tissue environment. *Blood*. 2007;109(11):4777-4785. Prepublished on 2007/02/10 as DOI 10.1182/blood-2006-10-053280.
40. Pavlakovic H, Becker J, Albuquerque R, Wilting J, Ambati J. Soluble VEGFR-2: an antilymphangiogenic variant of VEGF receptors. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1207 Suppl 1:E7-15. Prepublished on 2010/10/27 as DOI 10.1111/j.1749-6632.2010.05714.x.
41. Holen KD, Belani CP, Wilding G, et al. A first in human study of SB-743921, a kinesin spindle protein inhibitor, to determine pharmacokinetics, biologic effects and establish a recommended phase II dose. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(2):447-454. Prepublished on 2010/05/13 as DOI 10.1007/s00280-010-1346-5.
42. Sun XD, Shi XJ, Sun XO, et al. Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion in vitro via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5. *Acta Pharmacol Sin*. 2011;32(12):1543-1548. Prepublished on 2011/10/12 as DOI 10.1038/aps.2011.130.
43. Gasnereau I, Boissan M, Margall-Ducos G, et al. KIF20A and Its Gene Product MKlp2 Are Increased During Hepatocyte Proliferation and Hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*. 2011. Prepublished on 2011/11/08 as DOI 10.1016/j.ajpath.2011.09.040.
44. Muller C, Gross D, Sarli V, et al. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007;59(2):157-164.
45. Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment. *Pediatr Clin North Am*. 2008;55(1):97-120, x. Prepublished on 2008/02/05 as DOI 10.1016/j.pcl.2007.10.014.

46. Rossler J, Taylor M, Georger B, et al. Angiogenesis as a target in neuroblastoma. *Eur J Cancer*. 2008;44(12):1645-1656. Prepublished on 2008/07/11 as DOI 10.1016/j.ejca.2008.05.015.
47. Sugahara KN, Teesalu T, Karmali PP, et al. Coadministration of a tumor-penetrating peptide enhances the efficacy of cancer drugs. *Science*. 2010;328(5981):1031-1035. Prepublished on 2010/04/10 as DOI 10.1126/science.1183057.
48. Zhang C, Zhu C, Chen H, et al. Kif18A is involved in human breast carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2010. Prepublished on 2010/07/03 as DOI bgq134 [pii] 10.1093/carcin/bgq134.
49. Taniwaki M, Takano A, Ishikawa N, et al. Activation of KIF4A as a prognostic biomarker and therapeutic target for lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2007;13(22 Pt 1):6624-6631. Prepublished on 2007/11/17 as DOI 13/22/6624 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-07-1328.
50. Takahashi S, Fusaki N, Ohta S, et al. Downregulation of KIF23 suppresses glioma proliferation. *J Neurooncol*. 2011. Prepublished on 2011/09/10 as DOI 10.1007/s11060-011-0706-2.

Tables

Table 1

Human gene	Gene product	VEGF vs Control (mean)	q-value	Ratio % EC-EST/Non-EC-EST*
KIF11	kinesin family member 11	23.22	0.10	--
CENPL	centromere protein L isoform 2	4.56	0.29	--
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial precursor	4.39	0.01	--
CENPE	centromere protein E	4.05	0.29	--
ECSM2	hypothetical protein LOC641700	3.45	0.00	--
CD34	CD34 antigen isoform a	2.96	0.00	--
CLDN5	claudin 5	2.88	0.29	--
DPY19L1	dpy-19-like 1	2.65	0.02	--
MYC1	myc target 1	2.59	0.00	--
ZNF521	zinc finger protein 521	2.59	0.00	--
CDH5	cadherin 5, type 2 preproprotein	2.54	0.00	--
SOX18	SRY-box 18	2.48	0.29	--
C13orf3	hypothetical protein LOC221150	2.28	0.29	--
SOX17	SRY-box 17	2.28	0.10	--
LMO2	LIM domain only 2	2.20	0.29	--
LIFR	leukemia inhibitory factor receptor precursor	2.08	0.00	--
PECAM1	platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31 antigen)	2.86	0.00	171.25
SEC14L1	SEC14 (<i>S. cerevisiae</i>)-like 1 isoform a	2.60	0.00	61.47
TIE1	tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1	4.20	0.00	35.13
PDGFB	platelet-derived growth factor beta isoform 1, preproprotein	2.21	0.01	21.96
PRCP	prolylcarboxypeptidase isoform 1 preproprotein	6.37	0.00	17.56
RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	2.97	0.04	17.56
PODXL	podocalyxin-like isoform 2 precursor	2.27	0.00	13.17
NRP1	neuropilin 1 isoform a	2.42	0.00	12.55
MYO1C	myosin IC isoform c	3.25	0.00	11.86
ELK3	ELK3 protein	2.07	0.01	10.25
LAMA4	laminin, alpha 4 isoform 1 precursor	2.68	0.00	9.27
KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	3.19	0.29	8.78
CDH13	cadherin 13 preproprotein	2.41	0.10	8.78
IFNGR1	interferon gamma receptor 1 precursor	2.05	0.29	8.78
USP1	ubiquitin specific protease 1	3.29	0.26	6.59
SEC24C	SEC24-related protein C	2.71	0.05	6.59
C14orf108	chromosome 14 open reading frame 108	2.20	0.05	6.59
SERPINH1	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1 precursor	2.24	0.00	6.23
KIAA1671	KIAA1671 protein	2.41	0.18	5.85
FLI1	Friend leukemia virus integration 1	2.75	0.32	4.39
MKI67	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	2.55	0.26	4.39
BUB1	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog	2.50	0.44	4.39
TM4SF18	transmembrane 4 L six family member 18	2.34	0.44	4.39
NUSAP1	nucleolar and spindle associated protein 1 isoform 2	3.06	0.12	3.84
KIF20A	kinesin family member 20A	3.66	0.26	3.66
DOCK9	dedicator of cytokinesis 9	4.73	0.30	3.51
AKAP12	A-kinase anchor protein 12 isoform 2	2.62	0.25	3.29
RRM1	ribonucleoside-diphosphate reductase M1 chain	2.60	0.07	3.22
PDE4B	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific isoform 2	3.89	0.29	3.14
LMBR1	limb region 1 protein	2.43	0.29	3.14
PSMD1	proteasome 26S non-ATPase subunit 1	2.91	0.02	3.05
CLIC2	chloride intracellular channel 2	2.43	0.29	2.93
PRPF8	U5 snRNP-specific protein	2.10	0.07	2.85
NUP93	nucleoporin 93kDa	2.84	0.26	2.79
RBBP4	retinoblastoma binding protein 4	1.85	0.29	2.56
AMD1	S-adenosylmethionine decarboxylase 1 isoform 1 precursor	2.08	0.46	2.51
GOT2	aspartate aminotransferase 2 precursor	2.50	0.02	2.45

Figure legends

Figure 1: Affymetrix GeneChip screening for VEGF-A-induced genes during CAM vascularization

Solvent or human recombinant VEGF-A was deposited on the differentiated CAM at day 13 of development. (a, b, c) 24h later, tissue with visible newly formed capillaries (asterisk in c) was isolated and further processed for mRNA isolation (n=3 CAMs per group). Control CAMs (a) did not show any vascular alterations (arrow: border of the carrier plastic disc).

(d) Three CAMs stimulated by VEGF-A were compared to a pool of control CAMs to verify consistency in gene expression change. Significant correlations (Spearman's r ranging from 0.7 to 0.78, $p < 0.0001$) were found for all comparisons.

Table 1: Vascular gene expression program induced by VEGF-A

In silico endothelial-enriched ortholog genes (q-value < 0.5) regulated more than 2-fold in at least 2 of 3 comparisons are shown (n=53). As expected, and consistent with active vascular network formation, numerous key angiogenic regulators were induced, such as TEK, CD34, SOX18, LMO2, PECAM1, NRP1, FLI1 and KDR (italicized). Also note induction of mitotic kinesins, KIF11 (encoding Eg5) and KIF20A (in bold). 317 probe sets with significant increase after VEGF-A stimulation in at least two out of three comparisons are shown in table S1.

Figure 2: Eg5/KIF11 expression studies in normal and cancerous tissues

(a, b) Sections of human foreskin were double-stained with anti-Eg5, anti-CD31 and anti-podoplanin antibodies. CD-31 positive blood vessels were also positive for Eg5 (arrows). Triangle points to an Eg5⁺ lymphatic vessel. (b) Colocalisation of Eg5 and Podoplanin was also observed in lymphatic vessels (arrows). Triangle points to an Eg5⁺ blood capillary.

(c) qPCR data showed higher levels of KIF11 in blood vascular endothelial cells (HUVECs) compared to lymphatic endothelial cells (LECs) or fibroblasts (fibro). (d) Immunohistological staining reveals also expression of Eg5 in tumor blood vessels in three different glioblastoma patients (arrows). (e) Strong vascular expression for Eg5 is also found in renal cell carcinoma patients (arrows).

Figure 3: Chemical inhibition of Eg5 in normal and malignant cells

(a, b) Specific inhibition of Eg5 by dimethylenastron (DMN) leads to a dose-dependent blockade of cell proliferation in HUVECs and LECs. (c, d) Nearly complete inhibition is achieved in HUVECs and human brain endothelial cells (hCMEC/D3) after 72h at 1 μ M ($P < 0.0001$). (e, f) Glioma cell proliferation is inhibited with comparable efficacy. (g) Similar inhibition is also achieved in glioma cells of murine origin (Gl261). (h) Growth of five neuroblastoma cell lines is also inhibited significantly at 0.5 or 1 μ M DMN. (i) VEGF-A or FGF-2-induced proliferation of bovine aortic endothelial cells (BAE) is completely blocked by Eg5 inhibition ($P < 0.005$). (j) Eg5 blockade leads to significant increase in apoptotic cell death at 5 μ M, to a similar extent as staurosporin.

Figure 4: Inhibition of Eg5 or KIF20A protein function impairs *in vitro* angiogenesis in the absence of mitosis

(a-d) HUVECs grown on matrigel received indicated treatments. They were photographed at 4x magnification after 14h and morphologically annotated by the WIMASIS platform (ISP = Ispinesib; DMN = dimethylenastron; PAP = paprotrain; a) left image: unprocessed raw data, right image: automated annotation by WIMASIS). (e-h) Morphological parameters characteristic of *in vitro* angiogenesis are significantly reduced by chemical inhibition of Eg5 or Mklp2 protein.

Figure 5: Effects of kinesin blockade in chick and zebrafish embryos

(a) Control chick embryos showed normal expansion of the allantoic vesicle (al) at day 4.5 (HH24). Arrows point to the border of the vesicle. (b, c) Eg5 inhibition leads to complete arrest of CAM development; only a rudimentary tissue with a primitive vascular network develops. (d) Blockade of Eg5 function using ispinesib (ISP) from 24 to 48 hpf leads to a significant increase of embryos with modification of the posterior blood islands (PBI) or reduction of blood cells at 1 and 3 μ M. (e) Phenotype-score of Tg(kdr:EGFP) embryos injected with indicated morpholinos at 48 hpf. At doses higher than 0.5 ng, most embryos die and show severe edema and circulation defects. (e, f) At 0.2 ng, 46% of embryos displayed a mild phenotype with a curved and shortened tail and normal circulation, 34% had severe circulation defects, including pericardial edema (arrow), and 8% of embryos were dead (70x magnification). (g) Fluorescence micrographs of control and KIF11 morphants (115x magnification). Asterisk and arrows denote random vascular defects. DLAV = dorsal longitudinal anastomotic vessel, ISV = intersomitic vessels.

Figure 6: Eg5 inhibition reduces tumor angiogenesis in experimental tumor models

(a-d) U87-derived gliomas on the CAM were treated with indicated doses of Eg5 inhibitors. Biomicroscopy images were taken at day 4 of tumor development. Note visible induction of necrosis (arrows in b-d) at the tumor surface after Eg5 inhibition. (e-f) Immunohistological examination of experimental glioma. A dense vascular network occurred in control tumors, whereas Eg5 inhibition leads to reduced tumor angiogenesis underneath the tumor surface (asterisk), denoted by the dashed line (f), especially at two treatments of DMN (g) or ISP (h) per day. (i). A significantly higher number of poorly vascularized tumors (+) was within the ISP-treated group, whereas few tumors treated with ISP appeared highly vascularized (+++). (j, k) Ispinesib also reduced tumor size, weight ($p= 0.0205$) and vascular density ($p= 0.0025$) in an orthotopic renal cell carcinoma model.

Figure 1

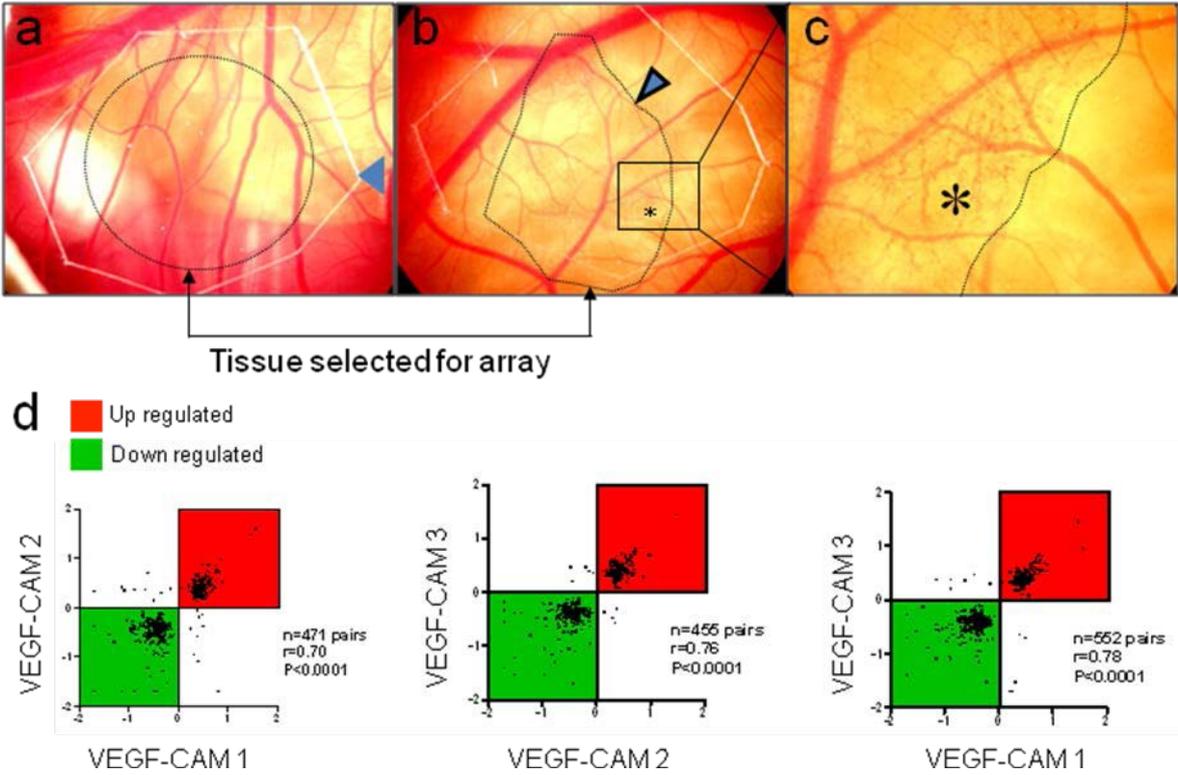
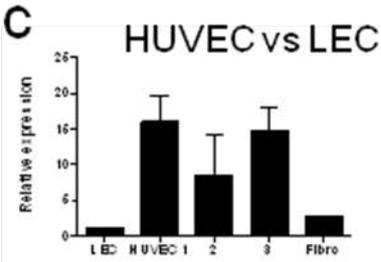
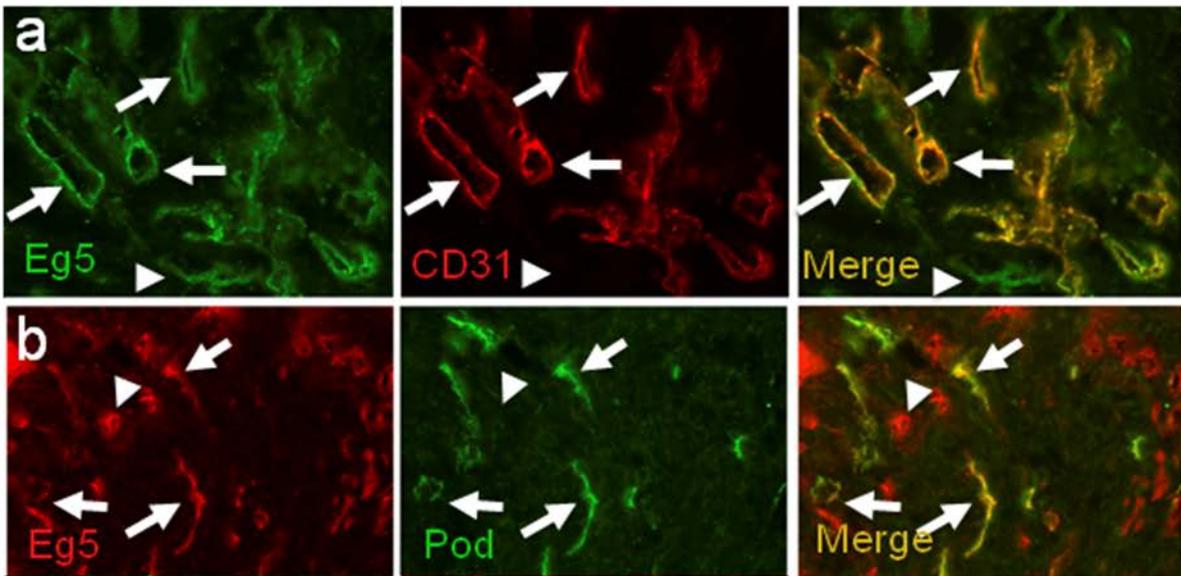
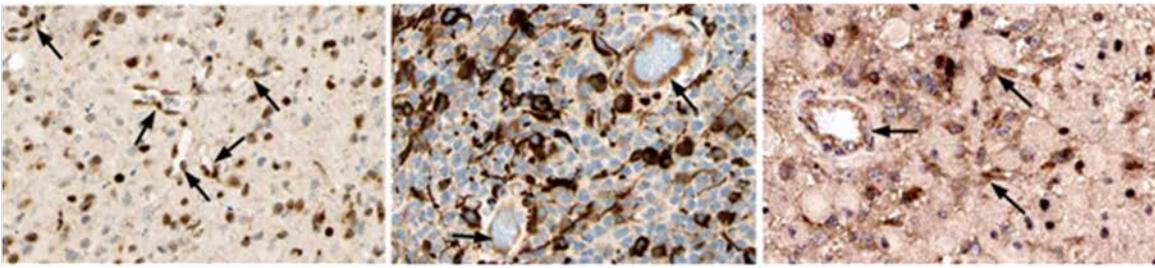


Figure 2

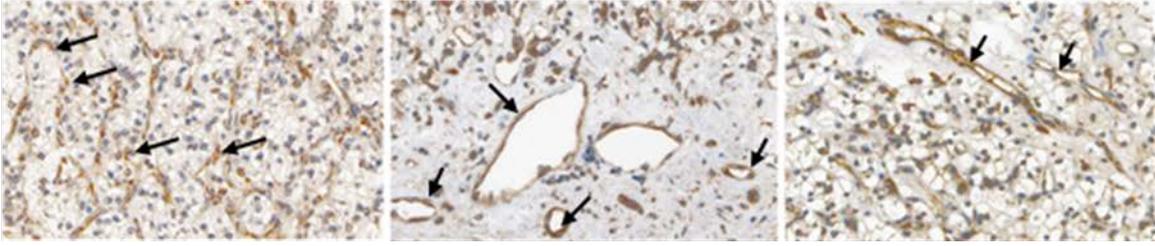
Normal human foreskin

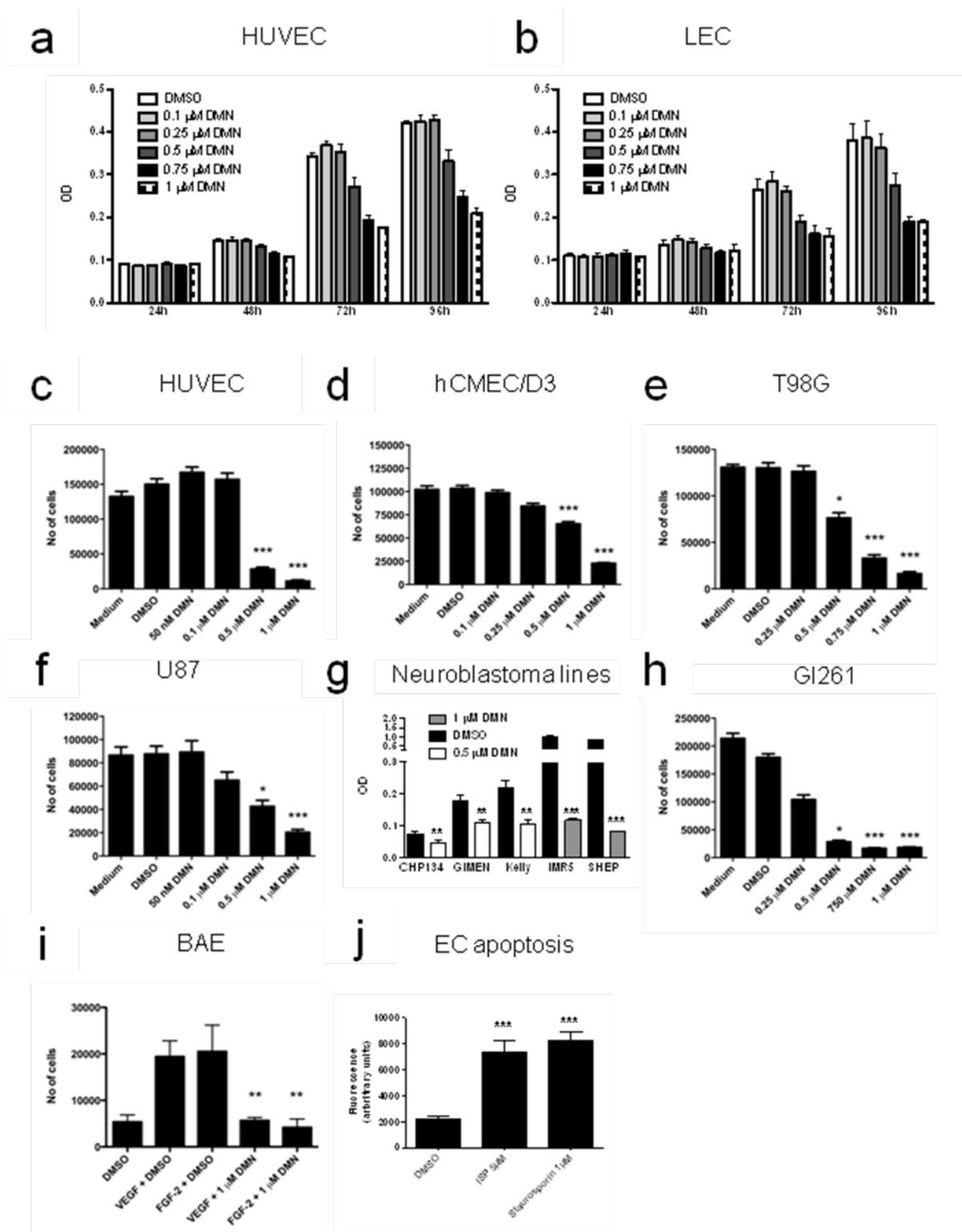


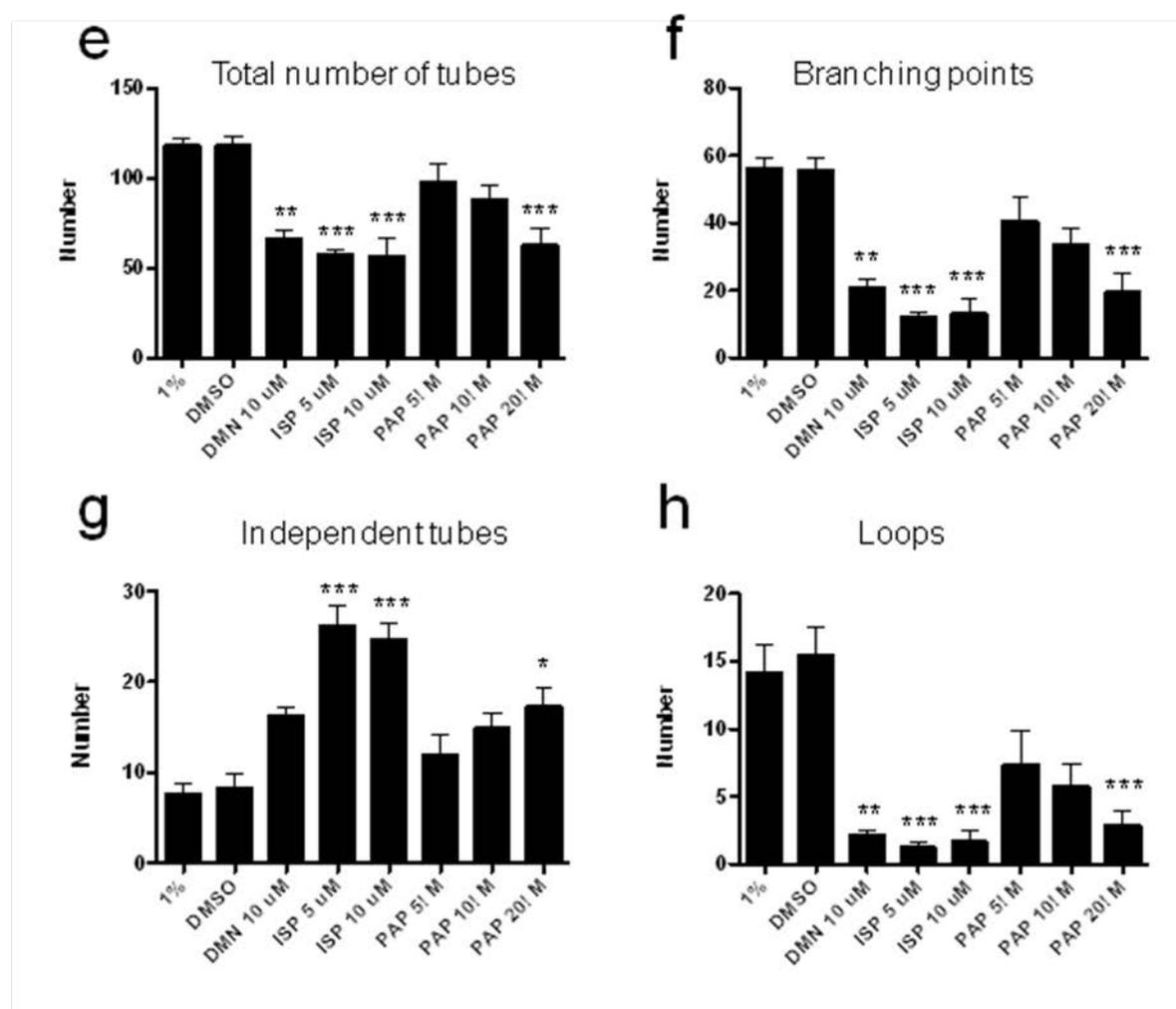
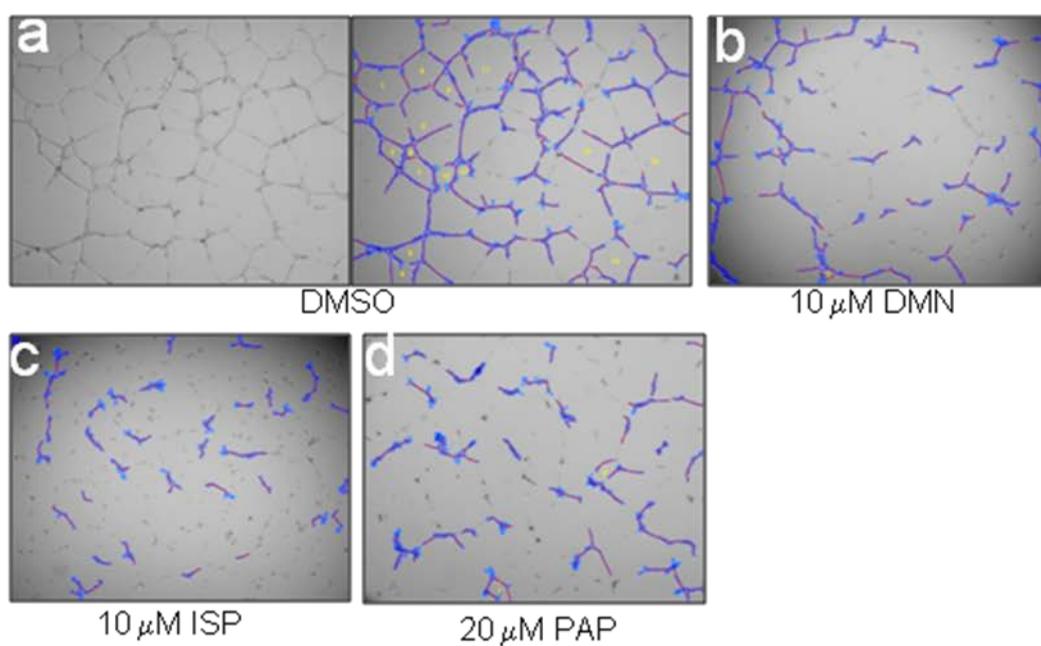
d Glioblastoma / Eg5



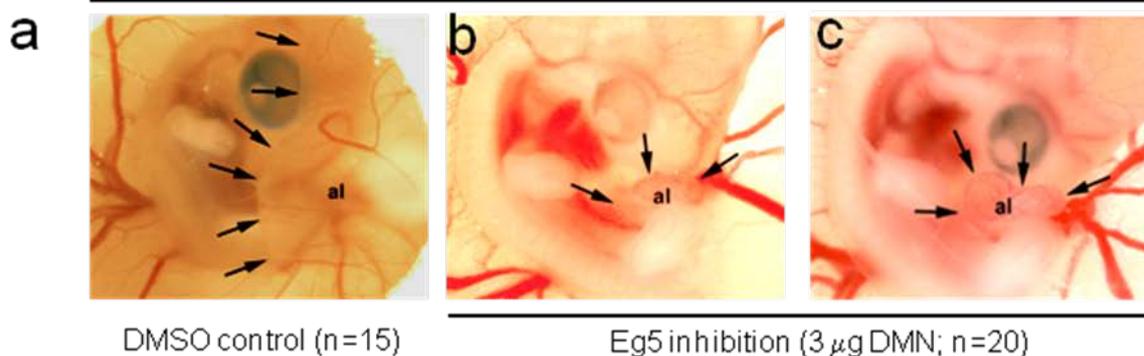
e Renal cell carcinoma / Eg5





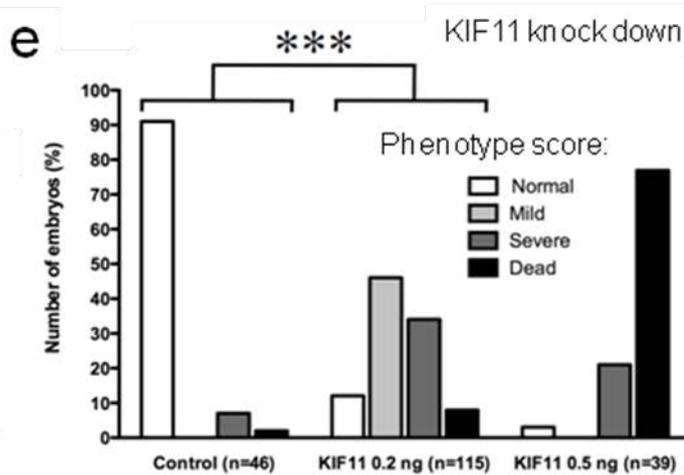
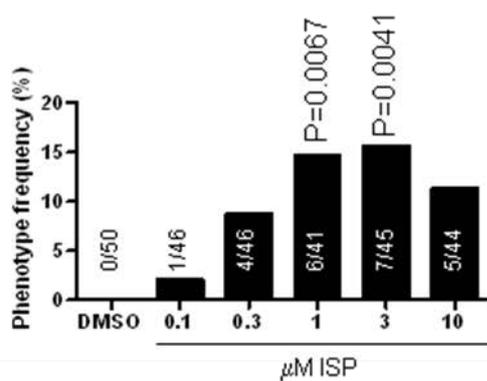


Chick embryos HH24

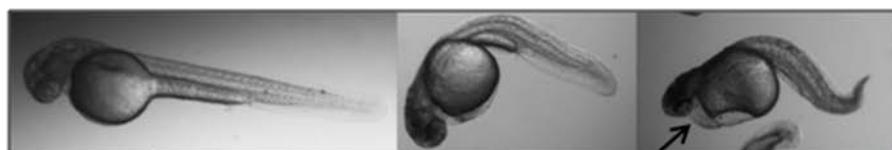


Zebrafish embryos

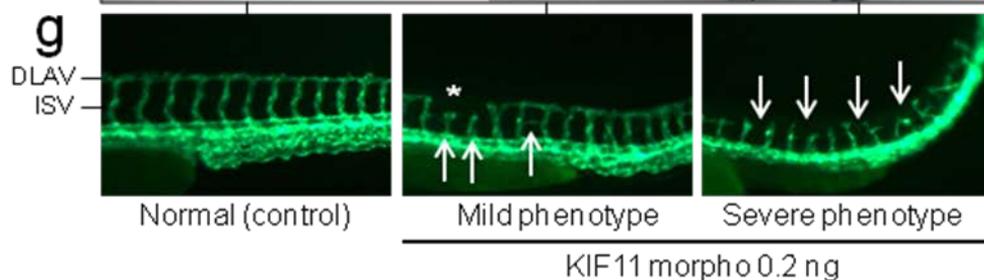
d Eg5 inhibition: Modified PBI/ reduced blood cells



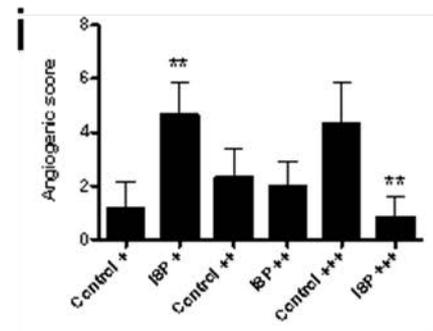
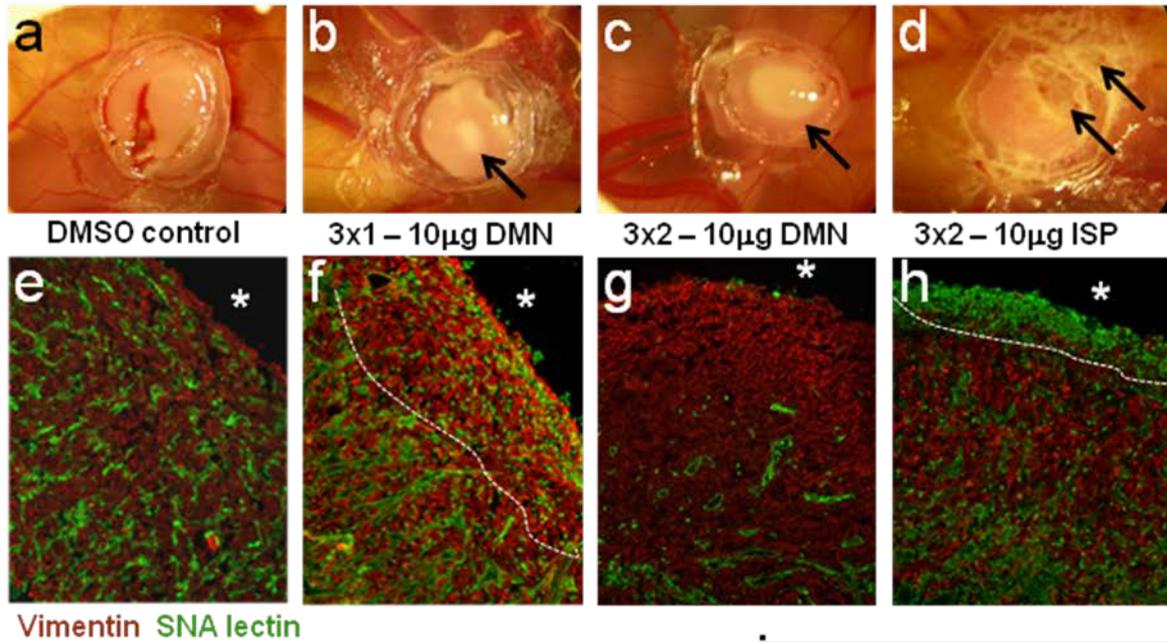
f KIF11 knock down



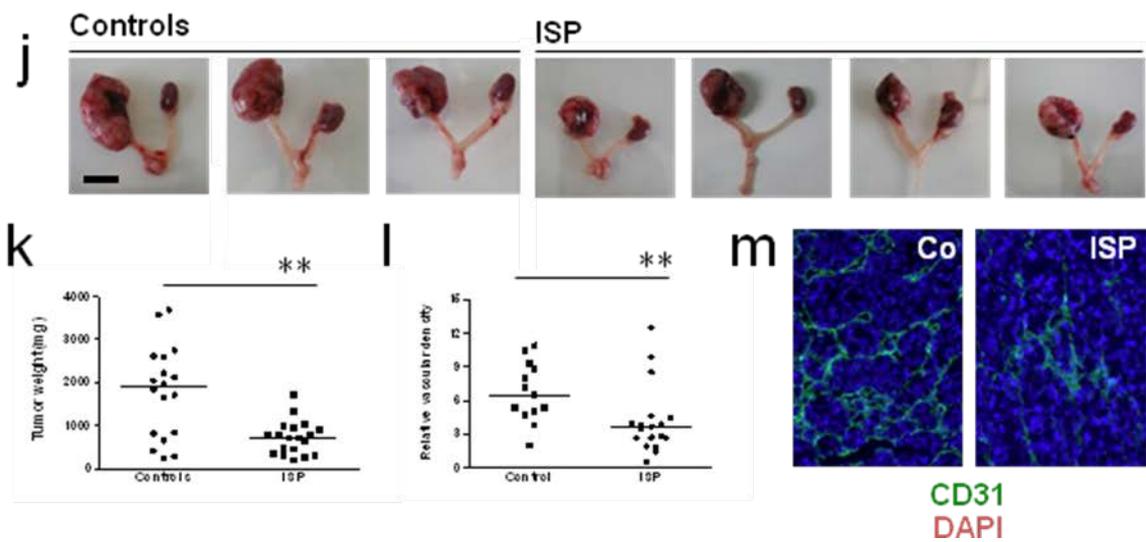
48 hpf



Experimental glioma model



RENCA model



Supplemental Methods

Molecular biology experiments

Microarray hybridization

Microarray experiments were carried out using standard Affymetrix protocols. To identify genes, which were regulated by VEGF-A with reasonable reproducibility, we applied the following selection criteria: a gene had to be regulated in at least two of the three comparisons more than 2-times and had to be found “present” in the VEGF-A group (if up-regulated by VEGF-A). 317 probe sets detected up regulated transcripts by VEGF-A using these criteria. Within this group were 80 probes, which were regulated more than 2-times in all three comparisons. To evidence consistency of VEGF-A-induced gene expression between the three different biological replicas compared to pooled control CAMs, we performed Spearman correlation analysis after log-transformation of fold-change expression. Original data sets are deposited at GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) with following identifiers: GSM364860, GSM364862, GSM364863, GSM364864.

Real-time RT-PCR (cell culture)

We prepared cDNA from 2 µg total RNA using Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed with Opticon2 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA), using SYBR green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany). The KIF11 probes were normalized using β-actin probes. Primers for KIF11 were: fwd, 5'-ggcagttgaccaacacaatg-3'; rev, 5'-tctagcatggccttttgctt-3'. Primers for β-actin were fwd, 5'-gcatcccccaaagttcaca-3'; rev, 5'-aggactgggccattctcctt-3'. Relative expression levels of transcripts were calculated with the $\Delta\Delta$ Ct-method using Microsoft Excel 2008 for Mac (Microsoft Corp. Redmond, WA).

Real-time RT-PCR (microarray verification)

mRNA used for microarray hybridization was used to verify fold-changes of indicated genes.

10 μ l SYBR Green (ABGene) were mixed with 6 μ l ddH₂O and 2 μ l primers and 2 μ l cDNA diluted 1/5th. 42 cycles were run on a Stragene thermocycler. Fold-change was calculated using the $\Delta\Delta$ Ct-method. Validated chick-specific primer sequences were as followed:

KIF4A	F	AGGGTGGTTTTGTCCCCTAC
	R	GGGCTTACACAGGCAATCAT
KIF11	F	GGAACAACCTGAGGCAGAAGC
	R	AGCAGGTCCCTCATCTGCATT
KIF15	F	TATCGGGATTCCAAGCTCAC
	R	TGGATCCTGGATGGACATTT
KIF20A	F	CAGCCAATTTACCAGCCATT
	R	CTCCTGTGGTGCTGAGTGAA
KIF23	F	CAACGTCAGGCTTCTGACAA
	R	CAGCTGCTTTGCTGCTACAC
RAB9	F	CTGCTGTCCCACGGTAGAAT
	R	CAGGCATGCTTGTAGTCAGG
HNRPH1	F	GATTTTCGGTCTTGGTGTTCG
	R	TAACTCGTGGCAGACACAGC

Cell culture experiments

Cell cultures

HUVECs were purchased (Promocell) and cultured as indicated by the manufacturer or isolated freshly from healthy donors using standard protocols. LECs were isolated from 2 healthy donors according to a published protocol¹. Tumor cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy Pointoise Cedex, France) with 10% fetal bovine serum, antibiotics and L-glutamine.

Proliferation assays (time course)

Cells (HUVECs, LECs and fibroblasts) were harvested, re-suspended in culture medium to a concentration of 10⁴ cells/100 μ l and seeded into wells of 96-well culture plates (100 μ l/per well). Neuroblastoma cell-lines (IMR5, SHEP, SKIN, Chp134, Gimen, Kelly) were used in a

concentration of 5×10^3 cells/200 μ l. For each condition and time point, 6-8 replicate wells were measured. At indicated time points, cells were fixed with 5% glutaraldehyde. After incubation for 20 minutes, the glutaraldehyde-containing medium was removed and plates were washed twice with deionized water. The plates were allowed to dry and 100 μ l crystal violet solution (0.1% in deionized water) was added to each well. After 20 minutes, the dye was removed; the plates were washed thrice with deionized water and dried again. The dye was resolved in 100 μ l of 10% acetic acid and absorption at 570 nm was determined using a micro plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Proliferation assays (at 72h)

Cells were seeded after 6 h serum starvation in 500 μ l full culture medium at indicated densities in 24-well cell culture flasks (LEC: 2.5×10^4 , HUAEC: 2.5×10^4 , HUVEC: 2×10^4 , hCMEC/D3: 2×10^4 , BAE: 2×10^4 , U87: 1.5×10^4 , T98G: 1×10^4 , GI261: 7.5×10^3). Cells were treated with inhibitor at indicated doses and after 72 h, cells were trypsinized and counted on a Beckman Coulter counter. DMSO at the highest inhibitor concentration served as control treatment.

Apoptosis quantification

1×10^3 HUVECs per well were seeded in 96 plates in complete medium. Inhibitors and positive control (1 μ M staurosporin) were added at indicated concentrations for 24 h. Caspase substrates (Promega) were added to each well for 30 min and fluorescence measured on a plate reader. Two independent experiments were pooled and analyzed using the Kruskal Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

Adhesion assays

HUVEC were pretreated for 14h with solvent or Eg5 or Mklp2 inhibitors and indicated concentrations. 8000 HUVECs were seeded on 96-well culture dishes coated with indicated

ECM proteins: collagen (100µg/ml BD Biosciences), fibronectin (0.5µg/ml, Sigma), laminin (5µg/ml, Sigma) and vitronectin (0.5µg/ml, Sigma). One hour later, cells were washed, stained with Coomassie Blue and photographed at 20x magnification. Statistical analysis of the percentage of normally spread cells was done using the Krusal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

Scratch wound assay

HUVECs (2.5x10⁴ cells/well) were seeded in 96-well plates (Essen Imagelock™; essenbioscience.com) coated with collagen (BD Biosciences) and allowed to adhere for 6 hours. Confluent cells were starved overnight in Endothelial Cell Growth Medium (Promocell) without growth factors and serum. The 96-pin WoundMaker (Essen) was used to create simultaneously precise and reproducible wounds in all wells. Non-adherent cells are removed with reduced medium. HUVEC were treated with inhibitors at indicated concentrations and the plate was placed in IncuCyte™. Wound images were acquired automatically at 2 hours intervals. Statistical analysis of the wound closure area was performed at the 18h time point using the Krusal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

Histology, in situ hybridizations and Western Blots

Immunofluorescence (cell spreading assay)

HUVECs are seeded for 1h on coverslips coated with 100µg/ml of collagen (BD Biosciences). After rinsing with PBS fixation with PAF 4% they were permeabilized with PBS-triton, blocked with BSA and incubated with mouse monoclonal anti α -tubulin (1:1000, Sigma T5168) for 2h at room temperature. Cells are rinsed and incubated with goat anti mouse antibody coupled with Alexa 488 (Molecular Probes), phalloidin-

tetramethylrhodamine B isothiocyanate conjugate (1:1000, P1951 Sigma) and counterstained with DAPI (Invitrogen).

Immunofluorescence (in vitro angiogenesis assays)

In vitro angiogenesis cultures are directly fixed by adding 10 μ L of PAF 4% to each well and rinsed with PBS. Cell nuclei are stained with DAPI and cultures are mounted in fluoromounting medium (Electron Microscopy Science). For assessment of cell proliferation during tubulogenesis, HUVEC are treated for 14h with BrdU (Invitrogen) at 1 μ M and seeded on reduced matrigel. BrDu incorporation is revealed with a FITC-coupled monoclonal anti-BrdU antibody (Becton Dickinson) and cultures are mounted as described above.

Immunofluorescence (human foreskin)

Foreskin of 2 – 3 year-old boys (3 specimens) were taken directly from the operating theatre. Specimens were rinsed in PBS, incubated in 15% and 30% sucrose and embedded in tissue freeze medium (Neg50; Richard-Allan Scientific, US) without any fixation. Cryosections of 16 - 20 µm thickness were prepared. Non-specific binding of antibodies was blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 10 min. Primary antibodies were rabbit-anti-human CD31 (1:100; Abcam, Cambridge, UK), mouse-anti-human podoplanin (1:100; ReliaTech, Wolfenbüttel, Germany) and rabbit-ant-human Eg5 (1:500; Abcam ab37009). Secondary antibodies (1:200) were Alexa 588-conjugated donkey-anti-rabbit and Alexa 594-conjugated goat-anti-mouse (Molecular Probes / Invitrogen, Darmstadt, Germany). Nuclei were counter-stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Immunodetection of Eg5 and Mklp2 (human protein atlas)

We queried the protein atlas² for expression of Eg5 and Mklp2. Images were retrieved from the following protein atlas samples: glioblastoma (patient ID 3092, Eg5 antibody HPA006916; patient ID 2726, Eg5 antibody HPA010568; patient ID 1537, Eg5 antibody CAB017617; ID 3022 and 2527, Mklp2 antibody HPA36909), renal cell carcinoma (patient ID 3061, antibody Eg5 HPA006916; patient ID 1722, Eg5 antibody CAB017617, patient ID 1901, Eg5 antibody CAB017617), normal heart (patient ID 2278, Mklp2 antibody HPA036909), placenta (patient ID 2515, Mklp2 antibody HPA036909), endometrium (patient ID 2175, Mklp2 antibody HPA036909) and oral mucosa (patient ID 1505, Mklp2 antibody HPA036909). Original images were downloaded and assembled in Adobe Photoshop CS4.

Immunodetection of CD31 (RENCA tumor model)

Vessel density was evaluated on frozen section of RENCA tumors. Primary antibody was anti-CD31 (1:100; Pharmigen), secondary antibody (1:400; goat anti-rabbit Alexa 488, Interchim) and section was mounted in DAPI-containing mounting medium (Fluoroprobes). Tumor angiogenesis was quantified using a digital pixel-based method, according to Bix et al.³. In brief, three sections per tumor (ISP, n=6, controls; n=5) were photographed at 20x magnification using the same acquisition parameters (Nikon NIS Elements software). Digital images were opened in Adobe Photoshop CS4 and mean pixel number per channel was determined (relative vessel density). The values of the two groups were compared using the Mann Whitney's U-test (GraphPad Prism).

In situ hybridization (human tumor sections)

In situ hybridization using QuantiViewRNA reagents was performed as recommended by the supplier (Panomics-Affymetrix). The use of branched DNA signal amplification is expected to provide up to a 500-fold amplification for low abundance mRNAs. Probe sets were designed by Panomics-Affymetrix from human CD31 NM_000442 or KIF20A NM_005733. Each probe set consists of 10 or more nucleotide sequence pairs. The oligonucleotide probe pairs are designed to hybridize to adjacent segments on the target RNA allowing the hybridization of a preamplification probe, which spans the hybridized probe pair. This signal is further amplified by bDNA and detected by label probes.

Formalin fixed paraffin embedded human glioblastoma biopsies were provided by the Regional University Hospital of Bordeaux. Five μm sections were collected on positively charged Superfrost slides and dried at 60°C for 30 min, then post fixed in 10% formaldehyde for 1 hour at room temperature. Slides were washed briefly in PBS twice before being air-dried. For deparaffinization, slides were incubated at 80°C for 3 minutes followed by submersion in 200 mL of Histo-Clear® reagent (National Diagnostics, USA) for 10 minutes

at room temperature with frequent shaking. Residual Histo-Clear reagent was removed by washing in 95 percent ethanol. Sections were circled with a Hydrophobic Pen (Vector Laboratories, USA) then subjected to boiling pretreatment (Panomics) for 10 min. Slides were submerged in distilled water twice, then incubated with a protease solution (Panomics) at 40°C for 10 min. After three washes, the slides were transferred into 4% formaldehyde for 5 minutes followed by rinsing once in 1x PBS. Preamplification and amplification steps were performed following Panomics-Affymetrix instructions. After incubation with the label probe, slides were washed and 200 µL of the AP-enhancer solution was added to the section and incubated at room temperature for 5 to 10 minutes. Fast Red was added to the tissue section for 30 minutes at 40°C in the dark. Slides were then rinsed in 1x PBS. To fix, slides were incubated in 4% formaldehyde for 5 minutes at room temperature then washed in 1x PBS and counterstained with Gill's hematoxylin before being mounted using Dako® Ultramount medium (Dako, USA). Results were viewed under bright field for CD31 (high rate expression per endothelial cell) or epifluorescence for KIF20A (low abundance mRNA per cell).

Fluorescent whole mount *in situ* hybridizations and imaging (zebrafish embryos)

Experiments were carried out as described, with minor modifications⁴. Double fluorescent *in situ* hybridizations have been performed as described⁵. The different antisense riboprobes were labelled either with digoxigenin labelling mix (Roche) or DNP-11-UTP ribonucleotides (Roche). Hybridizations were subsequently performed using the TSAi Plus system kit (Perkin Elmer). Briefly, after permeabilization, hybridization and washes, embryos were blocked in TNT buffer with 0.5% Blocking Reagent, and then with an anti-DNP peroxidase-conjugated preabsorbed antibody (1:200). Revelation was sequential: first, the green color was developed with tyramide-FITC. Then, after inactivation of the first antibody with H₂O₂, the embryos were incubated with an anti-DIG peroxidase-conjugated preabsorbed antibody (1:200) and the red colour was developed with tyramide-Cy3. Embryos were then extensively washed in TNT

buffer and then refixed in 1% paraformaldéhyde until analysis. Antisense riboprobes were made by transcribing linearized cDNA clones with SP6, T7, or T3 polymerase using digoxigenin (DIG) or DNP labelling mix (Roche), according to manufacturer's instructions. They were subsequently purified on NucAway spin columns (Ambion) and ethanol-precipitated. The *kif11* probe was cloned from zebrafish embryos using the TOPO cloning kit (Invitrogen) using the primers FW-AAGGAGCAGAGCCAAAACA, REV-TAGCTTCATCGCACCACTTG and FW2-CACTGAGGACCTGCAAGACA, REV2 TTTCCAGTGGAGGAATCTGG. The *flil* probe was synthesized as described ⁶.

Confocal imaging was performed using a Leica TCS SP2 confocal microscope. Digitized images were acquired using a DRY HC PL FLUOTAR 10× (NA 0.3) at 1024 × 1024 pixel resolution. For multicolor imaging, FITC was excited with a 488-nm laser line and the emission light was recorded between 500 to 535 nm. Cy3 was excited with a 561-nm laser line and the emission light was recorded between 570 to 715 nm. Sequential scan acquisition mode between lines was used to avoid cross talk and a 2-frames average mode was performed to reduce background noise. Series of 20 optical sections were carried out to analyze the spatial distribution of fluorescence, and for each embryo, they were recorded with a Z-step at 1.3 μm (20x magnification) and 2.4 μm (10x magnification). Image processing, including maximum projection of Z-stacks, was performed with the Leica LCS software (version 2.5).

Western Blot analysis

Cells are treated with 10ng/mL of human recombinant VEGF-A (PeproTech France) in medium 0.2% SVF during 24h. Cells were solubilized at 1×10^7 cells/mL in lysis buffer (1% NP-40, 20Mm Tris-HCl, pH 8.0, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 2mM EDTA and protease inhibitors; Roche). The lysates were rocked gently at 4°C for 30 minutes then centrifuged at 14000 g for 5 minutes. The supernatants containing proteins are dosed using the Bradford assay. 50μg of protein from each treatment were deposited and detected by anti-Eg5 antibody

(Abcam, Ab61199, 1:500). Membranes were scanned and pixel density quantified using a LICOR Odyssey Infrared Imaging System. Control density was set to “1” for graphical presentation.

Zebrafish experiments

Fish strains and maintenance

Zebrafish (*Danio rerio*) kdr:EGFP strains were obtained from Zebrafish International Resource Center, Oregon University, USA (grant P40 RR12546 from the NIH-NCRR) and then reared by the GIGA Zebrafish Platform, Liege University, <http://www.giga.ulg.ac.be>, in recirculating system (Techniplast, Italy) at a maximal density of 7 fish/L. The water characteristics were as follows: pH = 7.4, conductivity = 500 μScm^{-1} , temperature = 27°C. The light cycle was controlled (14h light, 10h dark). Fish were fed twice daily with dry powder (ZM Ltd, UK) with size adapted to the age, and once with fresh nauplii from *Artemia salina* (INVE Aquaculture, Belgium). Larvae aged less than 14 days were also fed twice daily with a live paramecia culture.

Breeding

The day before breeding, 2 males and 2 females were placed in breeding tanks out of the recirculating system, with an internal divider to prevent unwanted mating. On the day of breeding, fish were placed in fresh aquarium water and the divider was removed to allow mating. Eggs were collected every 30 minutes.

Morpholino injection and phenotype analysis

KIF11 zebrafish morpholino (5'-CTGGTACTTGTGATGATGCCATGTT-3') and control morpholino were purchased from GeneTools Inc. (Philomath, OR USA) and used as

recommended by manufacturer. Tg(kdr:EGFP) transgenic zebrafish were injected at the 1-2 cell stage with 0.2, 0.5 or 1 ng of KIF11 morpholino containing rhodamine dextran. Non-injected, damaged and non-fertilized embryos were sorted out directly after microinjection. At 24 hpf (hours post-fecundation) embryos were de-chorionated and treated with 1-phenyl 2-thiourea (BTU) to prevent pigmentation. At 48 hpf, embryos were anaesthetized using tricaine and phenotype-scored using the following criteria: class 1 = normal circulation, class 2 = normal circulation, affected tail and spasm, class 3 = affected circulation (reduced or absent) but heart beating, class 4 = dead or necrotic embryo. Embryos were analyzed using a Nikon SMZ 1500 and Leica MZ16F microscopes and images acquired by NIS Elements BR 2.30 or Leica Application suite 3.5.0 software.

Ispinesib treatment of zebrafish embryos

Normal zebrafish embryos (n=25 per dose; two independent experiments) were exposed to increasing doses of the specific Eg5 inhibitor ispinesib mesylate (0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μ M), from 24 to 48 hpf. Controls were treated with DMSO as used for the highest ispinesib dose. Dead embryos were counted; phenotype scoring of living embryos was done under a light microscope and blood flow and PBI (posterior blood island) morphology were scored as normal (=0) or reduced/modified (=1). As an additional morphological criterion number of blood cells was evaluated in a qualitative manner (0=normal, 1=reduced) and combined with the latter phenotype. Values of both experiments were pooled and analyzed using the Fishers Exact test with 99% interval of confidence.

Orthotopic renal cell carcinoma model (RENCA model)

10^5 RENCA cells (mouse origin) were implanted in the subcapsular region of the left kidney of Balb/C mice (n=10 per group). Animals were observed and weighed twice weekly. Mice were treated with ispinesib mesylate (5 mg/kg) or solvent control (80% D5W, 10% ethanol, 10% Cremophorl-E1) twice weekly by subcutaneous injection. Animals were sacrificed when a >20% weigh loss occurred or when they presented other signs of suffering. Animals were sacrificed by cervical dislocation and the urogenital apparatus was prepared for tumor size and weight evaluation and CD31 immunohistochemistry. Comparison of tumor weight was done using the Mann Whitney's U-test after pooling of two independent experiments.

Supplemental References

1. Albuquerque RJ, Hayashi T, Cho WG, et al. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med.* 2009;15(9):1023-1030. Prepublished on 2009/08/12 as DOI 10.1038/nm.2018.
2. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol.* 2010;28(12):1248-1250. Prepublished on 2010/12/09 as DOI 10.1038/nbt1210-1248.
3. Bix G, Castello R, Burrows M, et al. Endorepellin in vivo: targeting the tumor vasculature and retarding cancer growth and metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(22):1634-1646. Prepublished on 2006/11/16 as DOI 10.1093/jnci/djj441.
4. Thisse C, Thisse B, Schilling TF, Postlethwait JH. Structure of the zebrafish *snail1* gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development.* 1993;119(4):1203-1215. Prepublished on 1993/12/01 as DOI.
5. Pendeville H, Winandy M, Manfroid I, et al. Zebrafish Sox7 and Sox18 function together to control arterial-venous identity. *Dev Biol.* 2008;317(2):405-416.
6. Brown LA, Rodaway AR, Schilling TF, et al. Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos. *Mech Dev.* 2000;90(2):237-252. Prepublished on 2000/01/21 as DOI S0925477399002567 [pii].

Table S1

Complete list of 317 CAM genes induced by VEGF

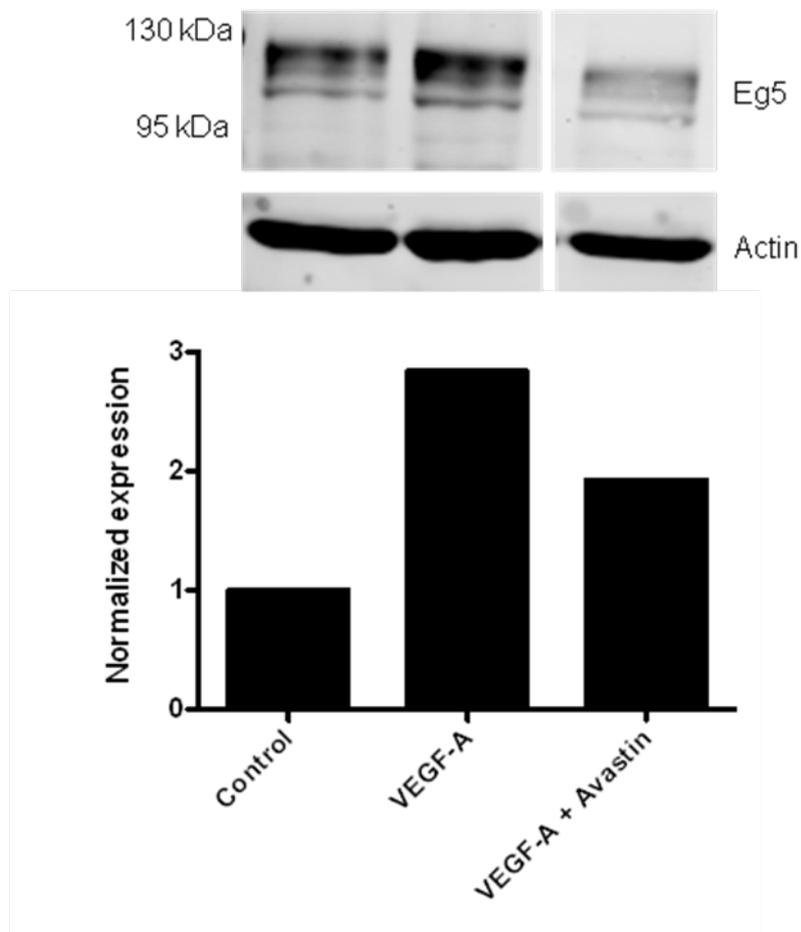


(provided as Microsoft Excel file)

The table contains the list of 317 probe sets detecting significantly up regulated transcripts in at least two out of three biological replicates. The five kinesins motor protein encoding genes are marked in red (KIF4A, KIF11, KIF15, KIF20A and KIF23).
I = Increased.

Figure S1

Expression of Eg5 protein in endothelial cells is stimulated by VEGF-A *in vitro* and inhibited by Avastin



HUVECs were treated with 10 ng/ml recombinant human VEGF-A for 24 h and Eg5 protein expression is analyzed by Western Blot. Note that co-treatment with VEGF-A blocking antibody Avastin abolishes Eg5 expression.

Table S2

Biological themes significantly enriched in genes up regulated by VEGF

Annotation Quarter 1		Enrichment Score: 11.6																			
Category	Term	Count	%	Pvalue	Genes	q1 Total	Top 10%	Top 20%	q14 Enrichment	Benfornoni											
FP_FDR_KEYWORDS	Mitosis	22	10.68	1.37E-10	KIF23, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, NDC80, CDVPE, CDC20, SHC2, SHC4, NCARG2, FANCD3, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	205	103	192/205	1.122526	1.69E-13											
GOTERM_BP_FAT	GO:0046205-organella fission	25	12.136	1.53E-10	NFY2J, FANCD3, NUSAP1, NUSAP2, NCAPH, BUB1, NCAPH, HELLIS, CDCA3, KIF11, CDCA1, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, NCARG2, SHC4, CDNB2, PLK1, BUB1B	174	129	195/205	1.487070	1.54E-12	2.64E-12	1.62E-12									
GOTERM_BP_FAT	GO:0000220-nuclear division	24	11.65	1.74E-10	NFY2J, NUF2, NDC80, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	174	120	195/205	1.481505	1.15E-11	1.74E-12	1.94E-11									
GOTERM_BP_FAT	GO:0007067-mitosis	24	11.65	1.74E-10	NFY2J, NUF2, NDC80, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	174	120	195/205	1.481505	1.15E-11	1.74E-12	1.94E-11									
GOTERM_BP_FAT	GO:0000007-M phase of mitotic cell cycle	24	11.65	1.98E-10	NFY2J, NUF2, NDC80, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	174	124	195/205	1.330940	1.69E-11	1.69E-12	1.69E-11									
FP_FDR_KEYWORDS	M cell cycle	30	14.563	1.36E-14	BUB1, CDNA2, HELLIS, CDCA3, CAPD, BUB4, KIF11, CDC2, NUF2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, HCN2, SHC2, SHC4, CAP, HCN3, NCARG2, CDNB2, BUB1, BUB3B	205	41	192/205	1.076305	4.10E-12	2.09E-12	1.81E-11	1.81E-11								
GOTERM_BP_FAT	GO:0000279-M phase	27	13.107	1.52E-14	NFY2J, FANCD3, NUSAP1, NUSAP2, NCAPH, BUB1, NCAPH, HELLIS, CDCA3, HSN1, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, CDNB2, PLK1, TOP2A, BUB1B	174	129	195/205	1.300463	1.44E-10	1.61E-11	1.44E-10	1.44E-10								
FP_FDR_KEYWORDS	M cell division	23	11.105	1.44E-14	NFY2J, KIF11, NDC80, NUF2, NUSAP1, NDC80, CDVPE, CDC20, SHC2, HCN3, SHC4, NCARG2, FANCD3, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	205	54	192/205	1.134037	2.99E-11	7.15E-12	1.39E-10	1.39E-10								
GOTERM_BP_FAT	GO:0000704-cell cycle	39	18.932	4.48E-13	NFY2J, BUB1, FANCD3, NCAPH, CDNA2, NCAPH, NCAPH, NUSAP1, NUSAP2, NCAPH, CDNA2, HELLIS, CDCA3, CAPD, CPB1, HSN1, BUB4, KIF11, UFL1, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, HCN2, SHC2, SHC4, GAK, NCARG2, BAGO1, HNRN3, CDNB2, BUB2, PLK1, TOP2A, BUB1B, BAGO1	174	76	195/205	1.907394	7.69E-10	1.52E-10	7.99E-10	7.99E-10	7.99E-10							
GOTERM_BP_FAT	GO:0022403-cell cycle phase	28	13.592	2.09E-12	NFY2J, BUB1, FANCD3, NCAPH, NCAPH, NCAPH, BUB1, CDNA2, HELLIS, CDCA3, HSN1, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, CDNB2, BUB1, TOP2A, BUB1B	174	64	195/205	1.255826	4.99E-09	7.69E-10	4.99E-09	4.99E-09								
GOTERM_BP_FAT	GO:0000278-mitotic cell cycle	26	12.621	1.72E-12	NFY2J, BUB1, FANCD3, NCAPH, NCAPH, NCAPH, NDC80, HELLIS, CDCA3, HSN1, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, CDNB2, BUB1, TOP2A, BUB1B	174	70	195/205	1.463312	1.48E-08	2.11E-09	1.47E-08	1.47E-08								
GOTERM_BP_FAT	GO:0051301-cell division	23	11.105	2.54E-11	NFY2J, KIF11, NDC80, NUF2, NUSAP1, NDC80, CDVPE, CDC20, SHC2, HCN3, SHC4, NCARG2, FANCD3, NCAPH, CDNB2, PLK1, NCARG, NCARG2, BUB1, BUB3B, CCNA2, HELLIS, CDCA3	174	295	195/205	1.051654	4.11E-08	1.39E-09	4.29E-08	4.29E-08								
GOTERM_BP_FAT	GO:0022402-cell cycle process	30	14.563	1.33E-10	NFY2J, BUB1, FANCD3, NCAPH, NCAPH, NCAPH, NDC80, HELLIS, CDCA3, HSN1, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUF2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, CDNB2, BUB1, TOP2A, BUB1B, BAGO1	174	65	195/205	1.121666	1.29E-07	2.51E-08	1.24E-07	1.24E-07								
GOTERM_OC_FAT	GO:0000793-condensed chromosome	13	6.3107	1.76E-08	NFY2J, NDC80, CDVPE, SHC2, NUSAP1, NCAPH2, SHC4, NCAPH, BAZ1B, NCARG, CDNB2, BUB1, BUB3B	100	120	127/102	1.050670	1.99E-05	1.93E-06	1.03E-05	1.03E-05								
GOTERM_OC_FAT	GO:0050119-cohesion	13	6.3107	1.89E-05	NFY2J, NDC80, KIF11, NDC80, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, NCAPH, BAZ1B, NCARG, CDNB2, BUB1, BUB3B	100	107	127/102	1.054001	1.69E-05	1.89E-05	1.89E-05									
Annotation Quarter 2		Enrichment Score: 6.2																			
Category	Term	Count	%	Pvalue	Genes	q1 Total	Top 10%	Top 20%	q14 Enrichment	Benfornoni											
GOTERM_BP_FAT	GO:0000279-M phase	27	13.107	1.52E-14	NFY2J, FANCD3, NUSAP1, NUSAP2, NCAPH, BUB1, NCAPH, HELLIS, CDCA3, HSN1, KIF11, CDC2, KIF15, NUF2, TPX2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, CDC20, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, CDNB2, PLK1, TOP2A, BUB1B	174	129	195/205	1.300463	1.44E-10	1.61E-11	1.44E-10	1.44E-10								
GOTERM_BP_FAT	GO:0000704-cell cycle	39	18.932	4.48E-13	NFY2J, BUB1, FANCD3, NCAPH, CDNA2, NCAPH, NCAPH, NUSAP1, NUSAP2, NCAPH, CDNA2, HELLIS, CDCA3, CAPD, CPB1, HSN1, BUB4, KIF11, UFL1, CDC2, KIF15, TPX2, NUF2, NUSAP1, CDVPE, NDC80, HCN2, SHC2, SHC4, GAK, NCARG2, BAGO1, HNRN3, CDNB2, BUB2, PLK1, TOP2A, BUB1B, BAGO1	174	76	195/205	1.907394	7.69E-10	1.52E-10	7.99E-10	7.99E-10								
GOTERM_OC_FAT	GO:005094-chromosome	23	11.105	1.67E-08	NFY2J, NUSAP1, NUSAP2, NUSAP1, NUSAP2, NUSAP1, NUSAP2, SHC2, SHC4, BAGO1, NCARG2, NCAPH, BAZ1B, NCARG, ZINC1, HNRN3, TOP2A, BUB1, BUB3B, BCL6, TOP2A, HELLIS	100	60	127/102	1.094375	1.67E-05	1.67E-05										

(table continues on next page)

Table S3

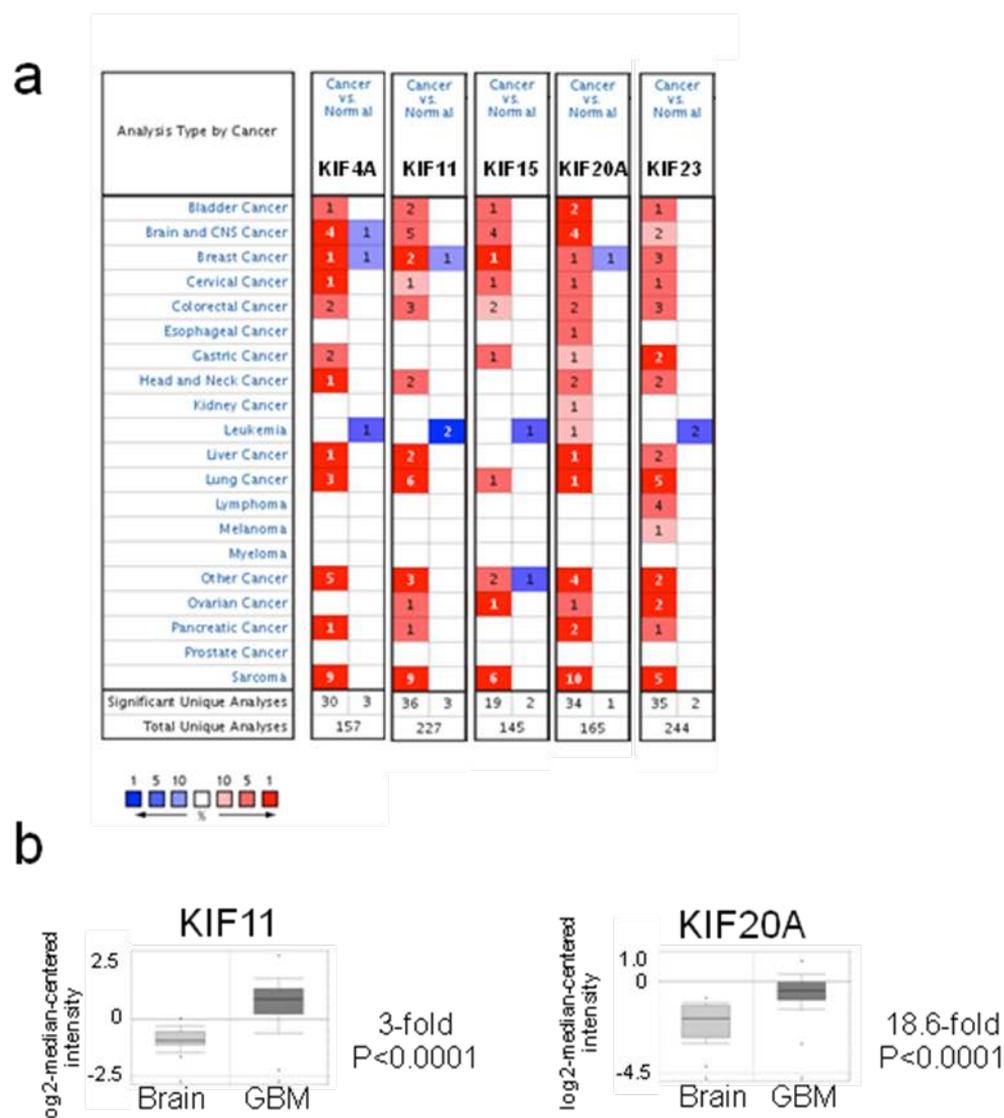
In silico prediction of endothelial versus non-endothelial enrichment of human kinesin family members

Gene symbol	Gene name	No. EC-EST	No. Non EC-EST	Enrichment EC-EST/Non EC-EST	FDR q-value	
KIF11	kinesin family member 11	2	0	-	0.10	Endothelial
KIF13B	kinesin family member 13B	3	2	6.59	0.26	
KIF18A	kinesin family member 18A	2	2	4.39	0.44	
KIF9	kinesin family member 9	1	1	4.39	0.57	
KIF15	kinesin family member 15	1	1	4.39	0.57	
KIF20A	kinesin family member 20A	5	6	3.66	0.26	
KIF2C	kinesin family member 2C	3	6	2.20	0.57	
KIF13A	kinesin family member 13A	1	2	2.20	0.62	
KIF1B	kinesin family member 1B	2	5	1.76	0.62	
KIF5B	kinesin family member 5B	3	8	1.65	0.62	
KIF3A	kinesin family member 3A	1	3	1.46	0.81	
KIF1C	kinesin family member 1C	1	4	1.10	0.94	
KIF22	kinesin family member 22	2	14	1.59	0.62	
KIF12	kinesin family member 12	0	3	-	0.53	
KIF17	kinesin family member 17	0	1	-	0.62	
KIF1A	kinesin family member 1A	0	3	-	0.53	
KIF21A	kinesin family member 21A	0	2	-	0.57	
KIF21B	kinesin family member 21B	0	4	-	0.49	
KIF23	kinesin family member 23	0	1	-	0.62	
KIF24	kinesin family member 24	0	1	-	0.62	
KIF27	kinesin family member 27	0	1	-	0.62	
KIF3B	kinesin family member 3B	0	7	-	0.33	
KIF3C	kinesin family member 3C	0	4	-	0.49	
KIF4A	kinesin family member 4A	0	3	-	0.53	
KIF5C	kinesin family member 5C	0	9	-	0.29	
KIFC1	kinesin family member C1	0	2	-	0.57	
KIFC2	kinesin family member C2	0	2	-	0.57	
KIFC3	kinesin family member C3	0	8	-	0.29	
				(no restriction for q-value)		

Genes encoding for kinesins were extracted from the Affymetrix chicken GeneChip by their gene symbol (KIFxx), subjected to ortholog screen and *in silico* assignment of endothelial vs. non-endothelial enrichment. Out of 36 unique kinesin genes, 12 showed preferential endothelial expression, whereas 16 were enriched in non-endothelial cells.

Figure S2

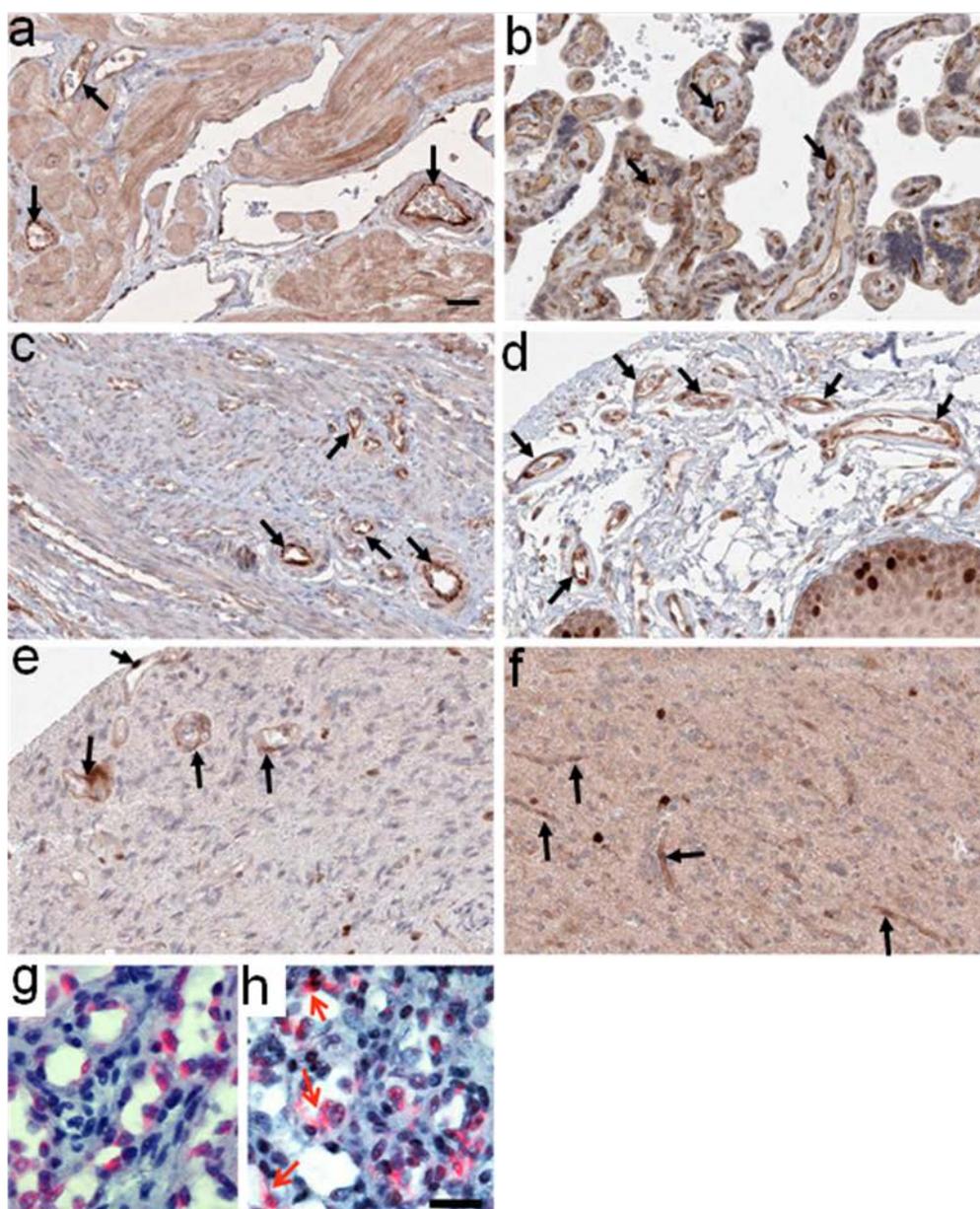
Expression analysis of VEGF-induced kinesins in various human tumors



(a) Oncomine database was queried for expression of indicated kinesins in human malignancies compared to normal tissue. The numbers in the cases indicated in how many different studies significant over expression was found. Intensity of the red and blue colour indicates rank-order of the gene by over expression and under expression in cancer versus normal tissue (eg. top 1%, 5% and 10%). (b) KIF11 and KIF20A are significantly over-expressed in glioblastoma samples (n=82) compared to normal brain (n=23).

Figure S3

Vascular expression of KIF20A/Mk1p2 in normal tissues and glioblastoma



Mk1p2 protein is expressed with varying intensities in endothelial cells (black arrows) in several normal tissues: (a) heart, (b) placenta, (c) endometrium and oral mucosa (d). In glioblastoma (e, f) a diffuse background signal is found in all cells, but several tumor capillaries can be recognized by stronger Mk1p2 expression in the endothelium (black arrows). (g) Endothelial cells in tumor capillaries can be identified by in situ hybridization using a PECAM1 probe. (h) KIF20A transcripts exhibit a very similar expression pattern in tumor capillaries in glioblastoma. Serial sections are shown (a-f: bar = 30 μ m; g, h: bar = 30 μ m).

Figure S4

Co-expression of VEGF-induced kinesins in brain tumors

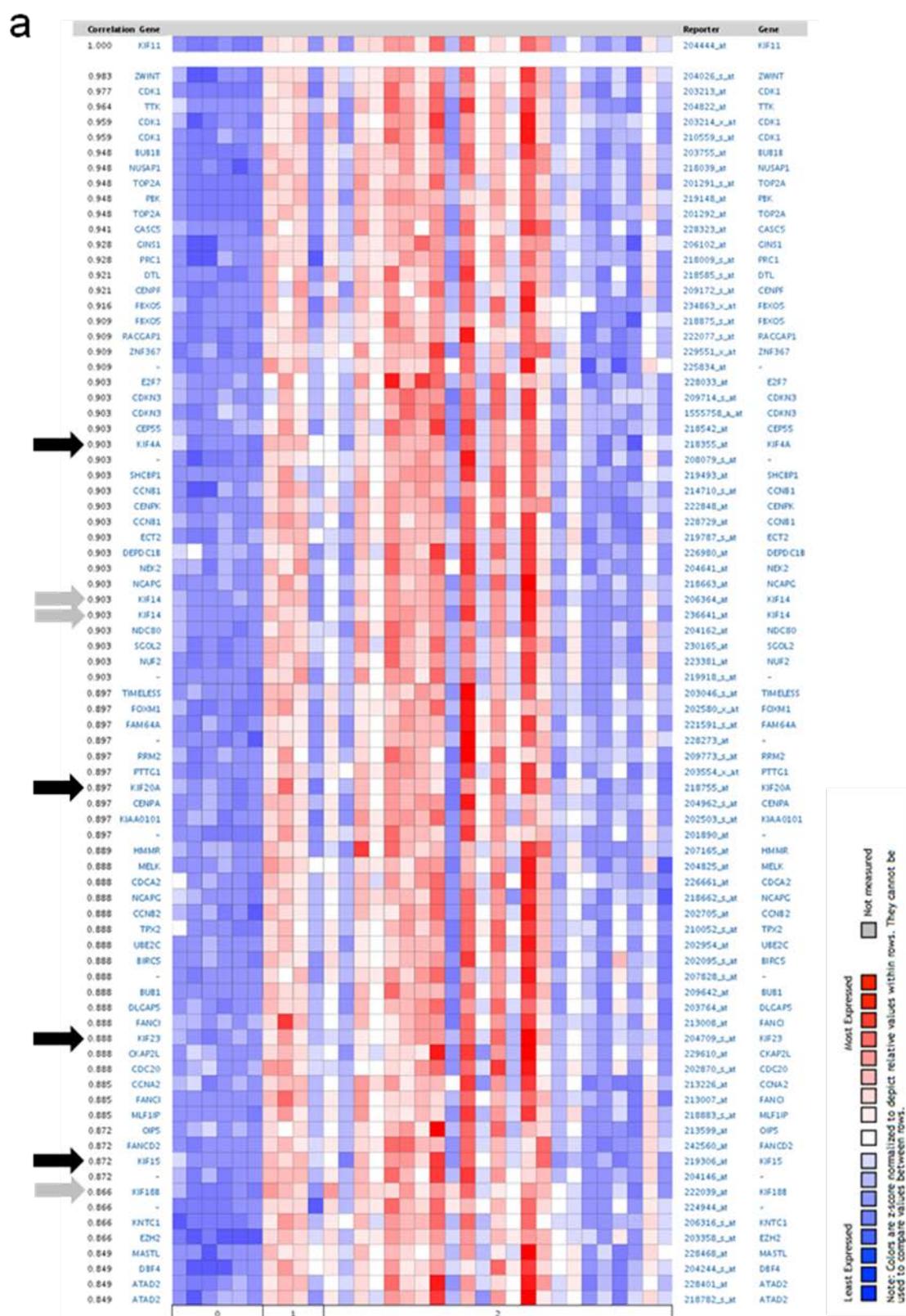


Figure S4 (cont'd)

Co-expression of VEGF-induced
kinesins in brain tumors

(a) French_brain study. Note that all kinesins induced by VEGF are highly co-expressed (KIF11 as a bait), with correlation values ranging from 0.903 for KIF4A to 0.872 for KIF15 (black arrows). Other kinesins such as KIF14 and KIF18B also show co-regulation (grey arrows). Legend: 0: Normal brain (n=6), 1: Anaplastic Oligoastrocytoma (n=4), 2: Anaplastic Oligodendroglioma (n=23).

Figure S4 (cont'd)

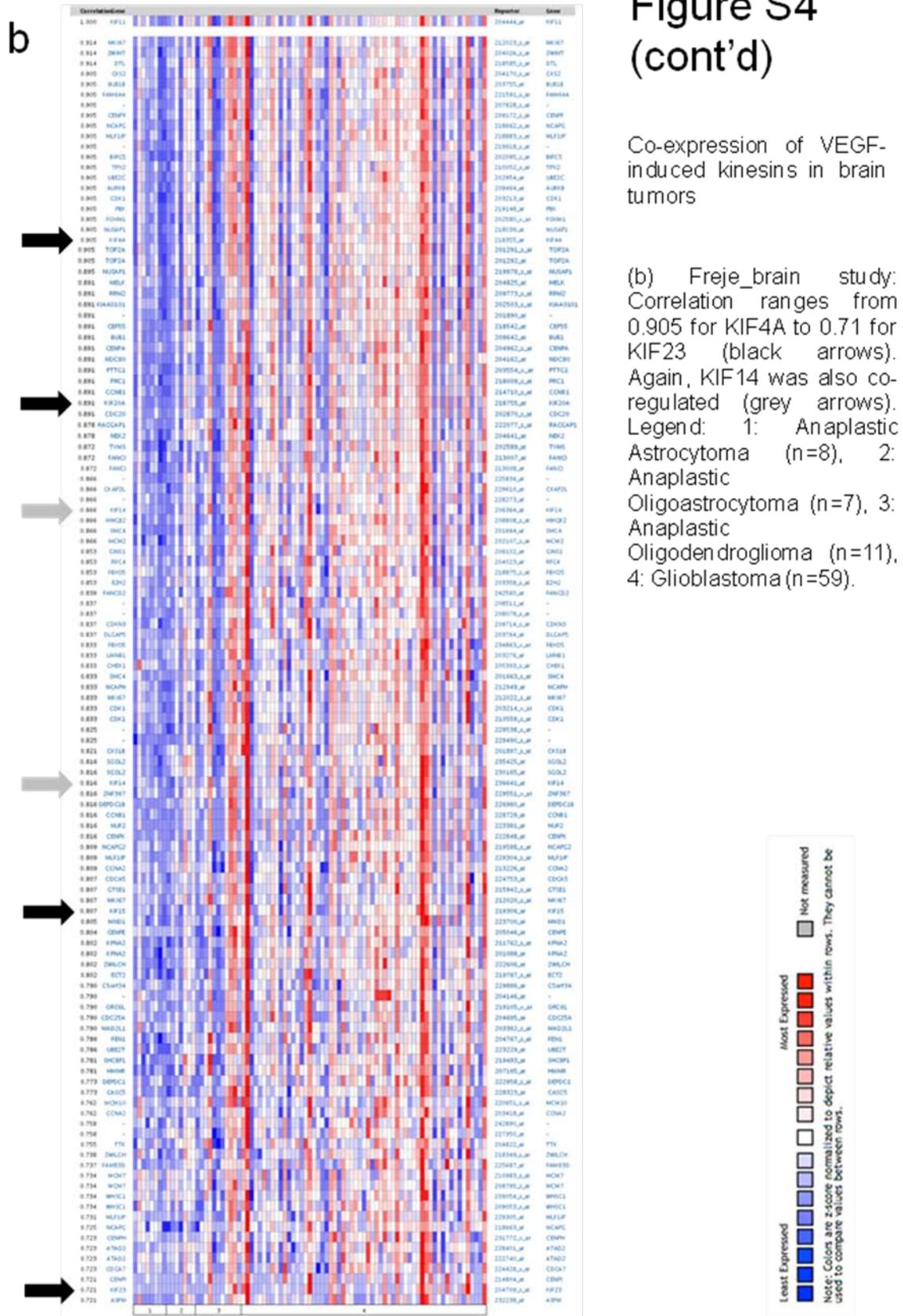
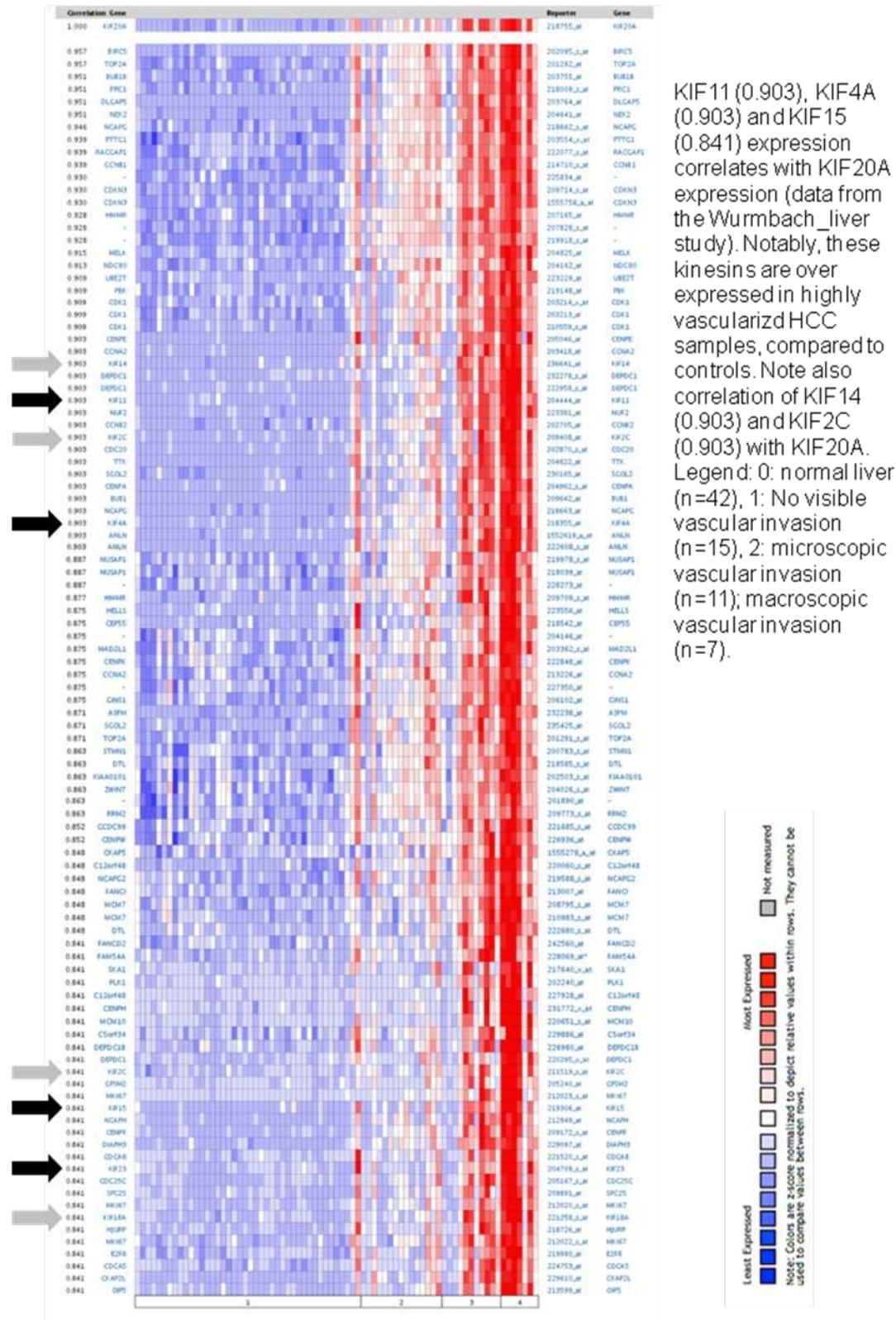


Figure S5

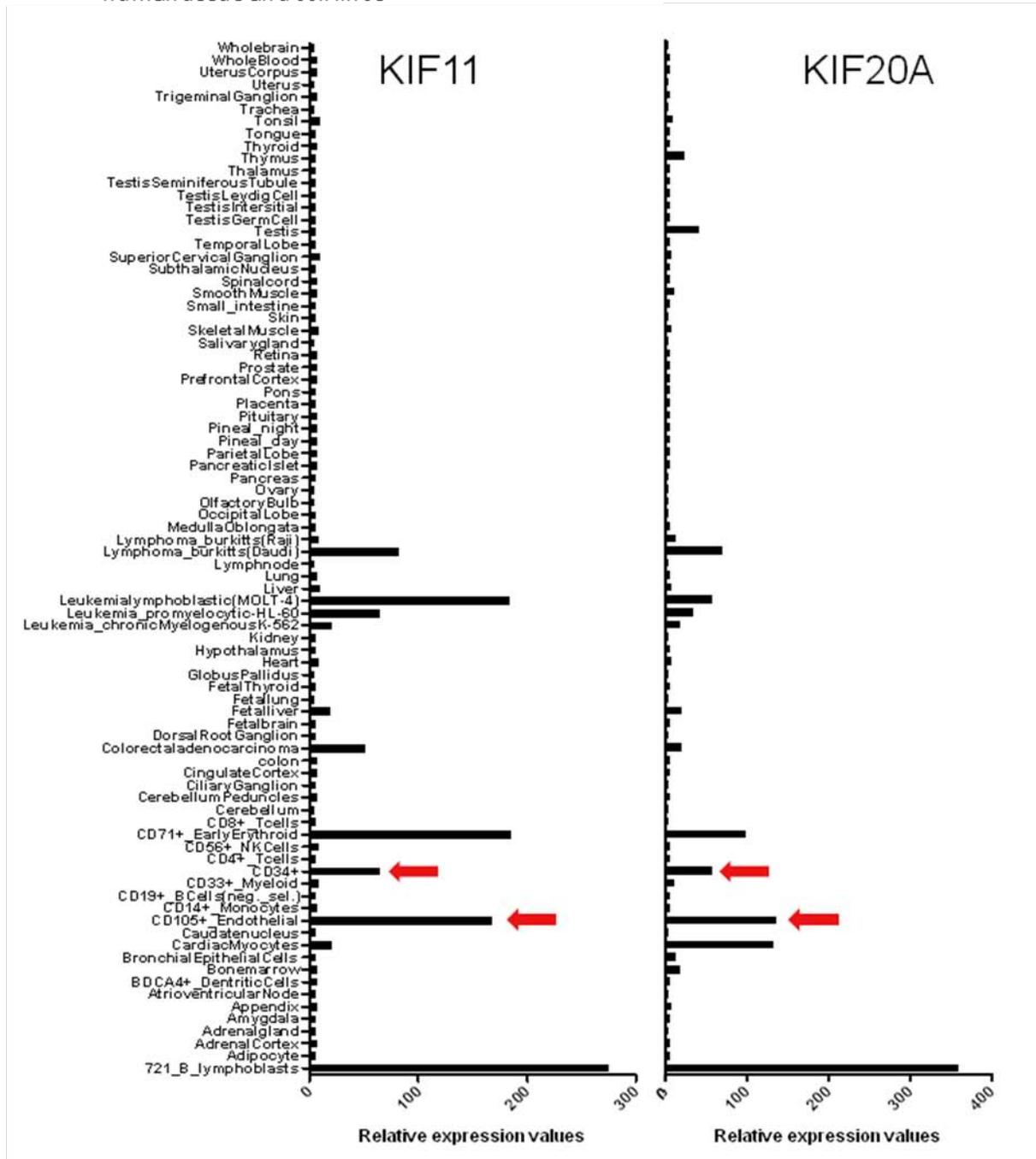
Expression of VEGF-induced kinesins depends on the vascularization status in hepatocellular carcinoma (HCC)



KIF11 (0.903), KIF4A (0.903) and KIF15 (0.841) expression correlates with KIF20A expression (data from the Wurbach_liver study). Notably, these kinesins are over expressed in highly vascularized HCC samples, compared to controls. Note also correlation of KIF14 (0.903) and KIF2C (0.903) with KIF20A. Legend: 0: normal liver (n=42), 1: No visible vascular invasion (n=15), 2: microscopic vascular invasion (n=11); macroscopic vascular invasion (n=7).

Figure S6

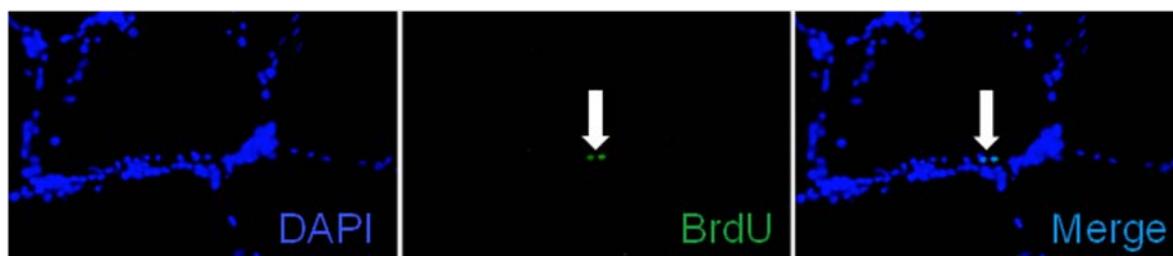
Relative expression levels of KIF11 and KIF20A transcripts in 84 human tissues and cell lines



High levels of KIF11 and KIF20A transcripts were essentially found in malignant lymphoma cells and CD105+ / CD34+ endothelial cells (red arrows). There is a high correlation of KIF11 and KIF20A expression levels throughout all tissues (Spearman $r=0.84$, $P<0.0001$). Data were obtained using the BioGPS project.

Figure S7

Cell proliferation is a rare occurrence in the tubulogenesis assay



To exclude that endothelial cell proliferation occurs in our assay conditions, cells were incubated with BrdU and allowed to form tubes on matrigel for 14h30. Anti-BrdU antibody (in green) rarely detected BrdU signal in cells, one example is shown (arrows).

Figure S8

Eg5 inhibition impairs endothelial cell adhesion and spreading

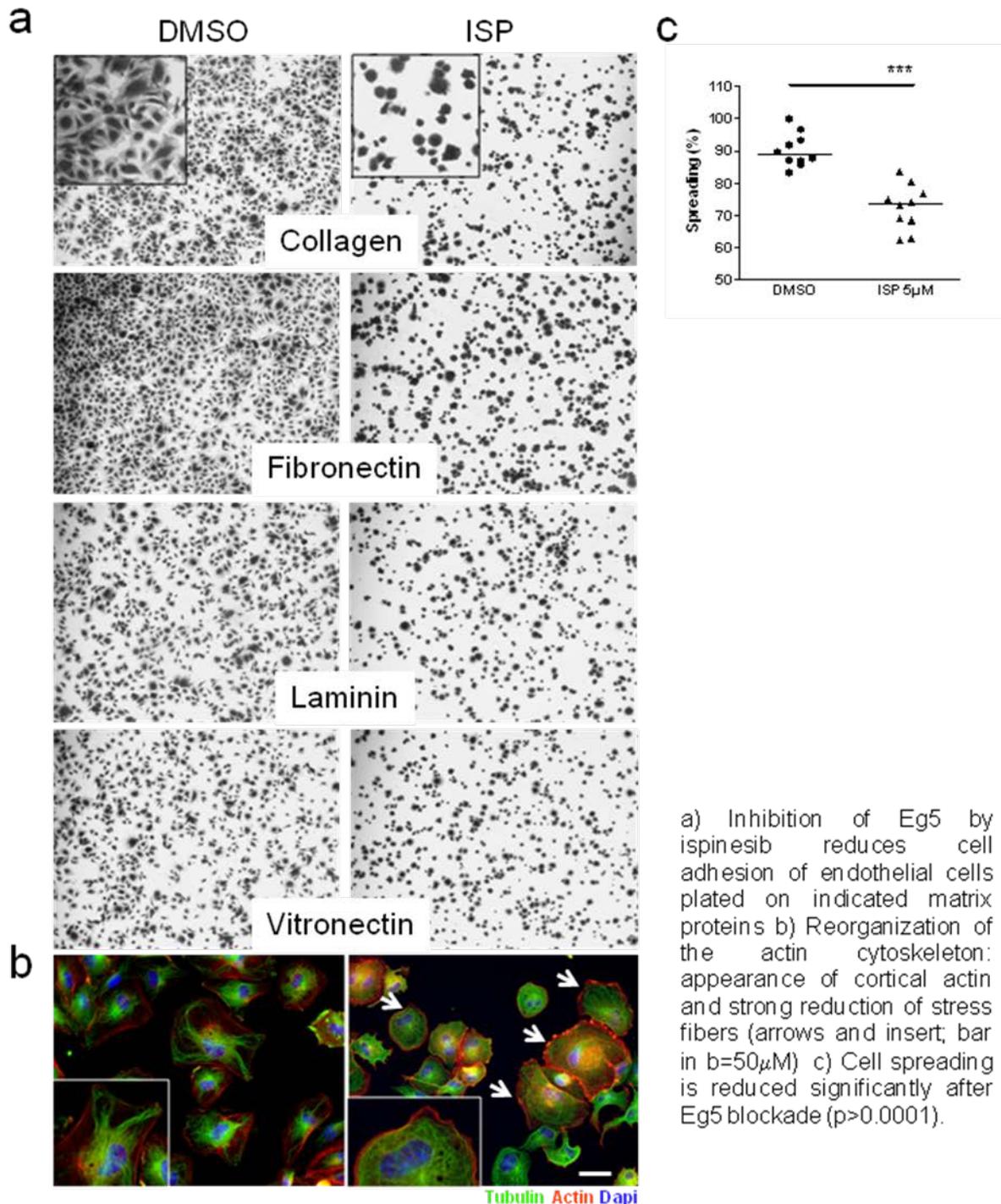
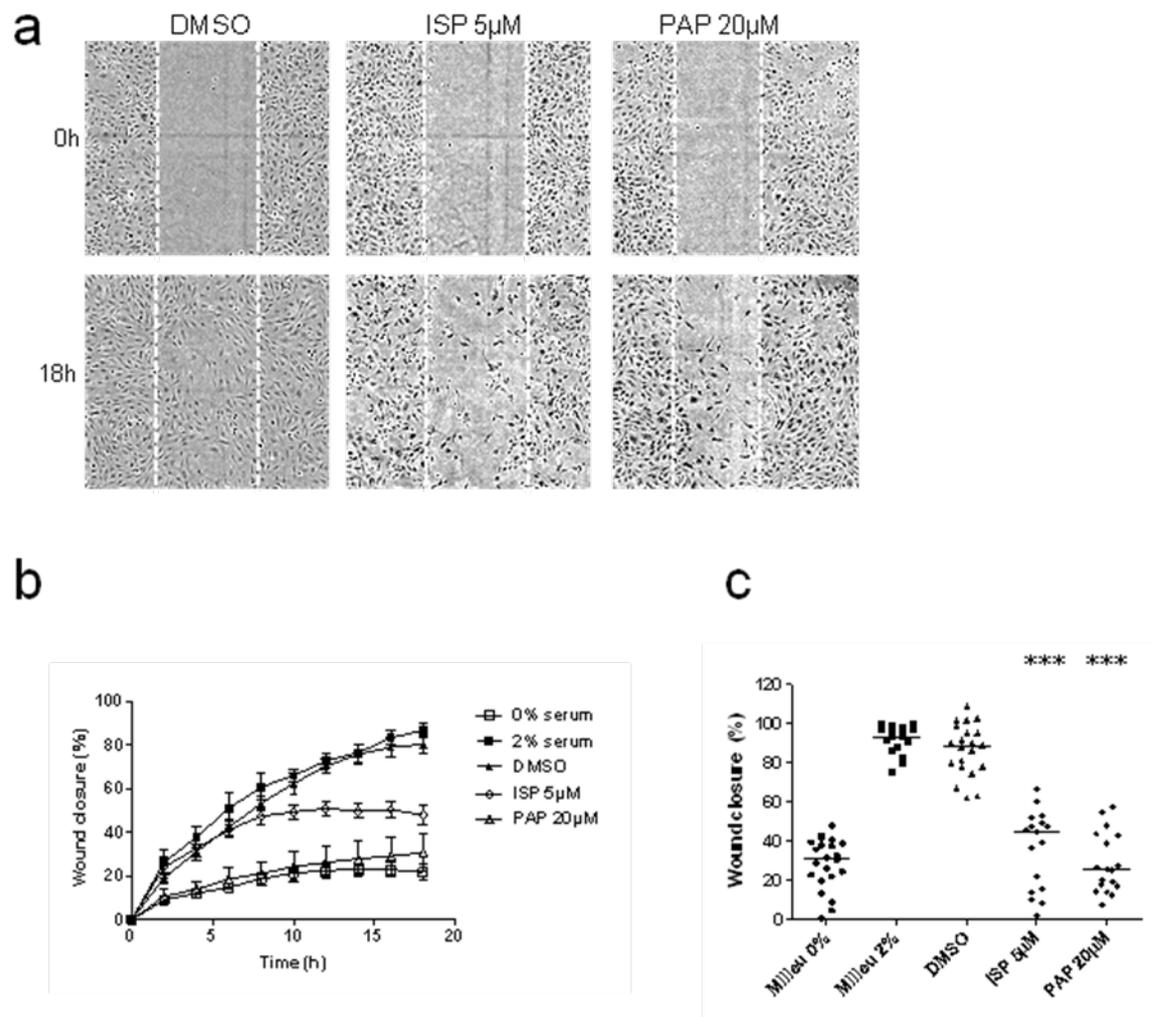


Figure S9

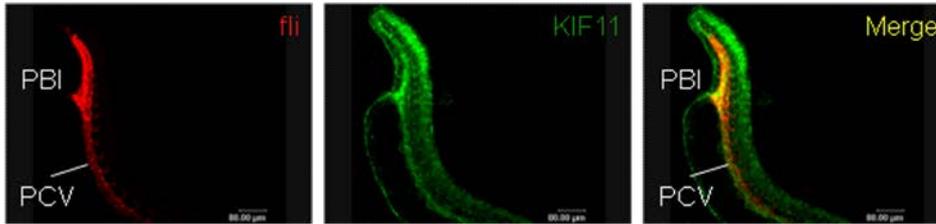
Eg5 inhibition impairs migration of HUVECs



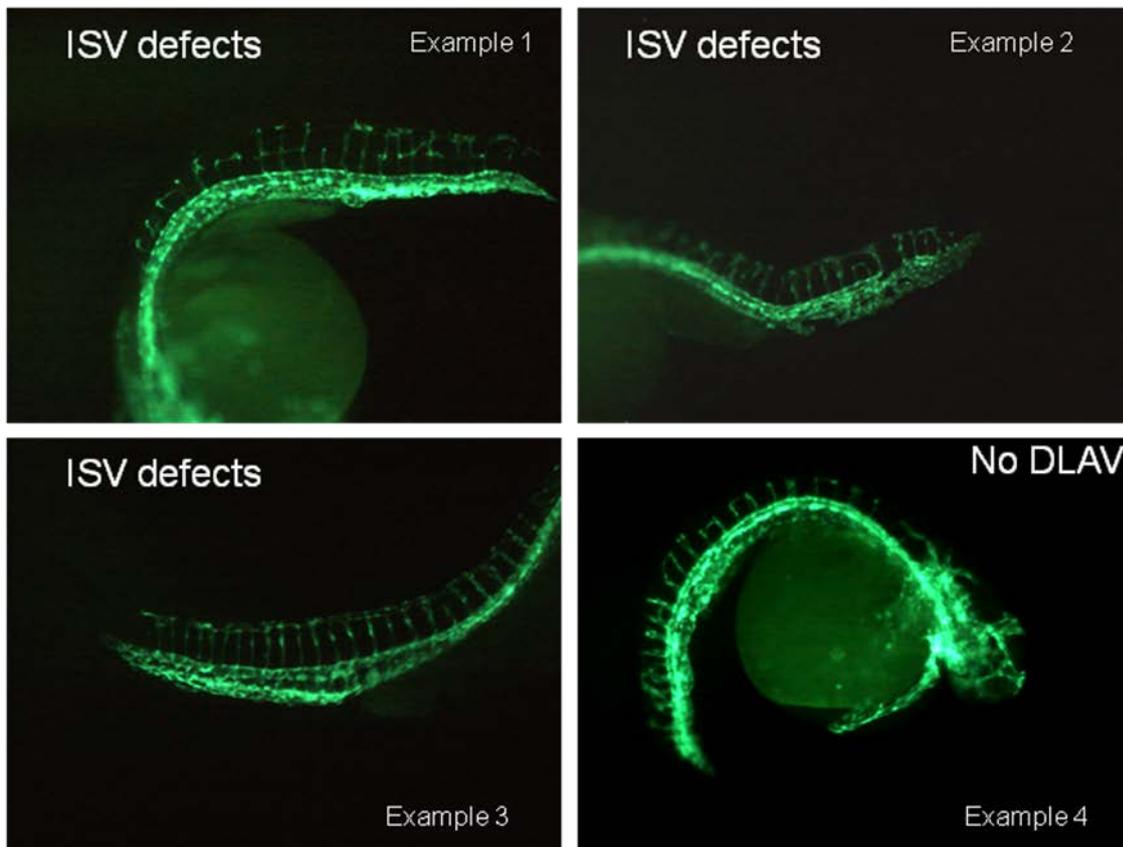
a) Representative pictures of HUVEC migration treated with indicated drugs at 0h and 18h after wounding. b) Quantification of cell migration into the wounded area over time. Percentage is indicated as mean \pm SEM. Note strong inhibition of EC migration by ISP and PAP. c) For statistical analysis, four experiments were pooled and percentages of wound closure at the last time point were compared. ISP and PAP significantly block EC migration ($P < 0.0001$).

Figure S10

a Fluorescence *in situ* hybridization; 24 hpf



b Vascular defects in KIF11 Tg(kdr:EGFP) morphants (48 hpf)



a) Zebrafish embryos at 24 hpf were hybridized with probes for the vascular/hematopoietic reporter transcript FLI1 (in red) or KIF11 mRNA (in green). Note that co-localisation occurs in the PBI and PCV. b) KIF11 knock-down embryos exhibited variable degrees of vascular malformation, mainly in the ISVs or the DLAV. Shown are four embryos with typical defects. Magnification x115.

Annexe 2

Au cours de cette thèse, j'ai eu l'occasion de participer à un projet dirigé par le Dr. Sophie Javerzat consistant à démontrer l'efficacité de l'Actemra (Tocilizumab) un anticorps thérapeutique anti-IL6R en combinatoire avec l'Avastin (Bevacizumab) dans les traitements du glioblastome. Les travaux ont consisté à traiter des lots de souris préalablement xéno greffées par la lignée U87 en orthotopique. Quatre groupes de traitements ont été appliqués : Sérum physiologique, Avastin seul, Actemra, seul, ou la combinaison des deux anticorps bloquants. L'effet des traitements a été évalué en termes d'augmentation de la durée de survie après xéno greffe, poids de la tumeur, index de vascularisation et index d'infiltration. Le traitement combinatoire a montré un effet significatif par rapport au traitement par l'Avastin seul, notamment une masse tumorale réduite, un index angiogénique proche de zéro, et un faible potentiel d'infiltration (qui est stimulé par l'Avastin seul).

Ma participation à ce projet a consisté dans un premier temps, à comparer l'histologie de tumeurs traitées à l'Avastin seul et avec la combinatoire. Pour cela, j'ai réalisé des coupes et colorations hématoxyline/éosine sur ces tumeurs. Dans un deuxième temps, j'ai recherché une régulation de facteurs pro-angiogéniques dans ces tumeurs ainsi que dans des cellules endothéliales traitées par l'Avastin et/ou l'Actemra. J'ai donc réalisé des hybridations de membranes commerciales (*R&D Systems*) à anticorps dirigés contre des facteurs majeurs impliqués dans l'angiogénèse. J'ai également fait des Western blot de confirmation pour les facteurs qui paraissaient inhibés par les traitements.

A partir des cellules endothéliales en culture, j'ai pu mettre en évidence une inhibition de l'endogline, un facteur proangiogénique connu, par la combinatoire AVA/MRA comparé aux conditions où seule une drogue a été utilisée ou au contrôle. L'angiostatine, un fragment protéolytique du plasminogène diminue la prolifération et la migration des CE. Cet anti-angiogénique est régulé de façon positive par la combinatoire AVA/MRA comparé aux conditions seules. La régulation de l'endogline et de l'angiostatine suggère un effet anti-angiogénique renforcé du traitement combinatoire. Cependant j'ai observé que la quantité de pentraxine-3, un anti-angiogénique qui se lie au FGF-2 pour bloquer son activité angiogénique, est fortement diminuée par la combinatoire (Figure Annexe 1), suggérant que toute la balance n'est pas en faveur d'un verrouillage de l'angiogénèse en culture.

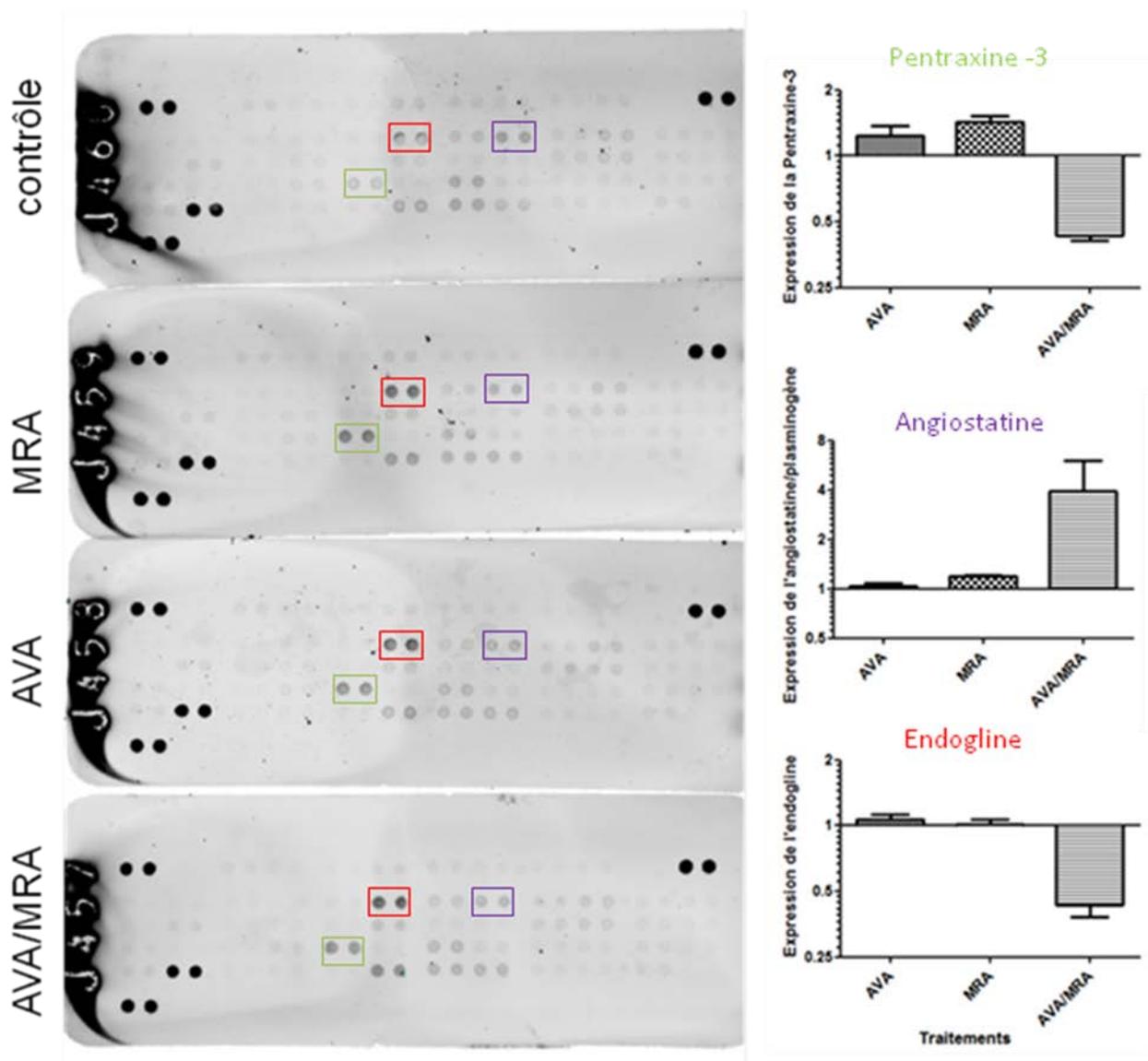


Figure Annexe 1 : Implication de la combinatoire Actemra/avastin dans la balance des facteurs pro et anti-angiogéniques *in vitro*. Scan de la puce à anticorps humains sur lesquelles ont été déposées les protéines des HUVEC non traitées ou traitées avec l'Avastin 2.5mg/mL, l'Actemra 2.5mg/mL ou la combinatoire.

Le même type d'analyse a été réalisé sur des extraits de tumeurs xéno greffées en utilisant des membranes à anticorps dirigés contre les antigènes murins pour appréhender la régulation au niveau du stroma. Les résultats suggèrent que la combinatoire AVA/MRA induit une diminution de certains facteurs comme MMP9, l'ostéopontine, IGFB et PF4.

Ces données font l'objet d'une publication en cours d'écriture dans laquelle l'induction de la transdifférenciation des cellules souches tumorales en cellules endothéliales par l'Avastin et non par la combinatoire est démontrée :

Combining Tocilizumab (Actemra) with Bevacizumab (Avastin) increases the antitumor efficacy of Bevacizumab in mice with glioblastoma.

Virginie Godard, Nathalie Truffaux, Pascal Bardeau, **Prisca Exertier**, Martin Hagedorn, Raphaël Pineau, Andreas Bikfalvi, Sophie Javerzat