

EGFL7 et miR126 : vers des convergences fonctionnelles

Virginie Mattot

Institut de biologie de Lille, CNRS-UMR8161, Université Lille-Nord de France, Lille, France

<Virginie.mattot@ibl.fr>

L'histoire d'*EGFL7* débute en 2003 lorsque ce gène a été identifié par notre équipe [1] et que ses premières propriétés ont été dévoilées. Il s'agissait en effet d'un nouveau gène exprimé par les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire mais également lors de processus angiogéniques physiologiques et pathologiques. La protéine *EGFL7* a été caractérisée comme une protéine sécrétée et l'identification de ses fonctions a été rapidement abordée mais malheureusement complexifiée par la présence du microARN miR126 dans la séquence intronique du gène *EGFL7*. Aujourd'hui, différentes fonctions pour *EGFL7* et son microARN intronique sont proposées dont certaines tendent à démon-

trer que miR126 et *EGFL7* participent à des processus biologiques similaires.

EGFL7 : une expression endothéliale précoce

EGFL7 s'exprime précocement au cours de l'embryogenèse puisqu'il est déjà détectable dans les blastocystes avant implantation. L'expression endothéliale d'*EGFL7* est démontrée dans l'embryon de souris dès le stade de 7,5 jours après fécondation [1]. Cette expression endothéliale va se maintenir au cours du développement embryonnaire et se poursuivra lors des phases de croissance postnatale, notamment au niveau des reins [1, 2] et de la rétine (publication sous presse). Chez

l'adulte, l'expression d'*EGFL7* chute dans la plupart des organes à l'exception des poumons, du cœur et des reins [2]. L'expression d'*EGFL7* est induite à nouveau dans des situations d'angiogenèse physiologique ou pathologique, notamment dans l'endothélium utérin au cours de la gestation [1, 3] et dans la vascularisation de tumeurs solides [2].

Outre son expression endothéliale, la protéine *EGFL7* a été détectée dans les cellules germinales primordiales isolées de gonades embryonnaires [4] et dans le cortex cérébral où les neurones ont été identifiés comme source d'*EGFL7* [5]. Enfin, des cellules tumorales (carcinome hépatique, gliome, tumeur du sein) sont capables d'exprimer *EGFL7*.

EGFL7 : une protéine de la matrice extracellulaire aux multiples fonctions vasculaires

EGFL7 renferme un peptide signal suivi d'un domaine EMI retrouvé dans des protéines de la matrice extracellulaire et de deux domaines *EGF-like* souvent impliqués dans des interactions protéine/protéine [1, 2]. EGFL7 humain renferme de plus un domaine RGD impliqué dans une interaction avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [6]. C'est une protéine sécrétée qui s'accumule dans la matrice de l'endothélium [7, 8]. En tant que protéine matricielle, EGFL7 favorise l'adhérence des cellules endothéliales mais moins efficacement que la fibronectine ou les collagènes [8]. *In vitro*, EGFL7 contrôle la migration cellulaire, en particulier celle des cellules péri-vasculaires, des fibroblastes et, de façon plus controversée, des cellules endothéliales.

L'inactivation d'EGFL7 a été entreprise chez le poisson-zèbre et chez la souris. L'inhibition d'EGFL7 chez le poisson-zèbre induit des défauts de circulation, des hémorragies et des œdèmes péricardiques chez 40 % des embryons. L'absence d'EGFL7 n'entraîne pas d'anomalies dans les premières étapes de formation des veines et artères mais elle induit des défauts de formation de la lumière des vaisseaux sanguins. À l'échelle cellulaire, l'absence d'EGFL7 génère des jonctions persistantes qui empêchent les angioblastes de se dissocier pour former un tube vasculaire doté d'une lumière [2]. Chez les premières souris *Egfl7*^{-/-}, l'inhibition de miR126 a été accidentellement et simultanément engendrée en plus de celle d'*Egfl7*. Les animaux alors générés présentaient un phénotype mixte *Egfl7*^{-/-} miR126^{-/-} caractérisé par une létalité embryonnaire partielle et, pour les animaux survivants, des retards de développement des vaisseaux du crâne, de la rétine et des coronaires embryonnaires, sans doute attribuables à miR126 [8]. Une seconde stratégie d'inactivation exclusive d'*Egfl7* a été ultérieurement entreprise et les animaux *Egfl7*^{-/-} naissent selon le rapport mendélien attendu, indiquant un développement embryonnaire normal. L'angiogenèse embryonnaire ou postnatale ne semble pas affectée par l'absence d'*Egfl7*, pas plus que l'angiogenèse induite chez les animaux adultes [9].

Les fonctions *in vivo* d'EGFL7 décrites à ce jour proviennent essentiellement de modèles de surexpression de la protéine par transgénèse. Ainsi, grâce à l'expression ectopique de la protéine EGFL7 dans les kératinocytes de souris transgéniques,

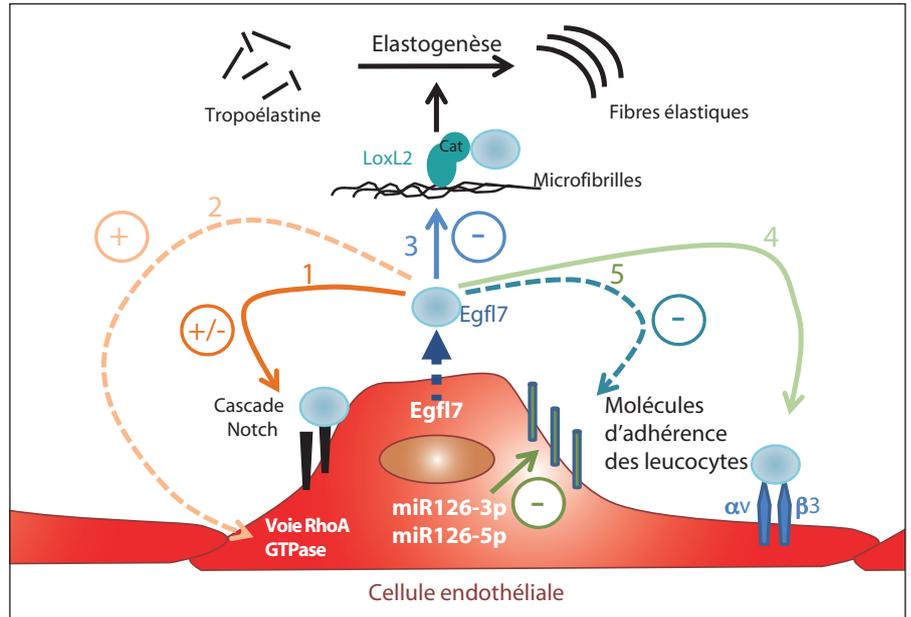


Figure 1. Fonctions convergentes d'EGFL7 et de miR126. EGFL7 est impliqué dans le contrôle de la cascade Notch (1), de la voie RhoA GTPase (2), de l'élastogenèse (3), et de l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes (5). EGFL7 interagit également avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (4). Parallèlement, miR126-3p et miR126-5p répriment l'expression de molécules d'adhérence pour les leucocytes.

EGFL7 a été identifié comme un inhibiteur des lysyl-oxydases, enzymes responsables de la conversion de la tryptoélastine soluble en fibres élastiques insolubles [7]. EGFL7 est en effet capable d'interagir avec le domaine catalytique des lysyl-oxydases et réprime ainsi leur activité. La surexpression d'*Egfl7* dans les cellules endothéliales par transgénèse a permis de montrer qu'EGFL7 intervient également dans la régulation de la cascade Notch [10]. EGFL7 est capable d'interagir avec les récepteurs NOTCH, notamment NOTCH4, et agit comme un antagoniste de la cascade au cours de l'angiogenèse postnatale ou comme un agoniste de cette voie de signalisation au cours de l'angiogenèse embryonnaire en suivant des mécanismes moléculaires non encore définis.

L'étude du rôle d'EGFL7 au cours de la tumorigenèse a aussi été abordée grâce à un modèle de surexpression. Des cellules tumorales mammaires ou pulmonaires de souris surexprimant *Egfl7* se développent plus rapidement après avoir été injectées chez des souris immunocompétentes. Cette croissance tumorale accrue n'est pas due à une variation des propriétés de prolifération, de migration ou d'ancrage des cellules tumorales surexprimant *Egfl7* ni à des modifications majeures de la vascularisation des tumeurs. En réalité, la surexpression d'*Egfl7* entraîne une inhibition de l'infiltration des tissus tumoraux par les cellules immunitaires,

ce qui crée un microenvironnement immunodéficient au sein de la tumeur et favorise donc sa croissance. D'un point de vue moléculaire, EGFL7 inhibe l'infiltration de la tumeur par les cellules de l'immunité en réprimant l'expression, par les cellules endothéliales, de molécules d'adhérence pour les leucocytes (CAM) telles que E-selectine, ICAM-1 ou VCAM-1 [11]. L'inhibition d'ICAM-1 par EGFL7 avait préalablement déjà été suggérée dans un modèle *in vitro* d'hypoxie et de ré-oxygénation de cellules endothéliales artérielles en présence d'EGFL7 [12]. L'implication de la voie NF- κ B dans le contrôle d'ICAM-1 par EGFL7 a alors été proposée, puisque l'hypoxie suivie de ré-oxygénation provoque une translocation massive de NF- κ B dans le noyau qui s'estompe en présence d'EGFL7. Les mécanismes moléculaires engendrant la modulation de la voie NF- κ B par EGFL7 restent encore aujourd'hui inconnus.

Plus récemment, EGFL7 a été impliqué dans l'activation de la voie RhoA, GTPase qui régule la morphologie ou l'adhérence des cellules endothéliales [13].

miR126 : un microARN majeur du développement vasculaire et tumoral

Le duplex miR126 enchâssé dans l'intron 7 d'*EGFL7* peut générer deux microARN matures : le brin guide du duplex miR126-3p et le brin passager miR126-5p.

L'expression physiologique de miR126 est également majoritairement endothéliale, tout comme celle de son gène hôte, et des régions promotrices communes ont été proposées pour *EGFL7* et miR126 [14].

Les fonctions de miR126 sont très largement étudiées dans différents processus physiologiques tels que le développement vasculaire ou l'érythropoïèse, mais elles concernent essentiellement le brin guide du duplex : miR126-3p.

L'inhibition de miR126 chez le poisson-zèbre [15] et son inactivation chez la souris [14] ont montré que miR126 est essentiel au développement vasculaire embryonnaire ou postnatal. *In vitro*, l'absence de miR126 inhibe la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF ou le FGF, suggérant un rôle pour miR126 dans la signalisation induite par ces facteurs de croissance. Des études par micropuces sur des cellules endothéliales n'exprimant plus ce microARN ont permis d'identifier *SPRED1* et *PIK3R2* comme des cibles potentielles pour miR126-3p. *SPRED1* et *PIK3R2* étant des régulateurs négatifs de la signalisation du VEGF ou du FGF en contrôlant respectivement la voie des MAP-kinases et la voie de la PI3 kinase, le contrôle de leur expression par miR126-3p est conciliable avec un rôle pour ce microARN dans le développement vasculaire.

L'expression tumorale de miR126 est inversement proportionnelle au pouvoir métastatique des cellules qui l'expriment. De même, l'expression de miR126 est faible dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus sains, et ce dans divers types de tumeurs (poumons, estomac, col de l'utérus, vessie et prostate). De nombreuses cibles pour miR126 sont déjà identifiées (*VEGFA*, *CRK*, *IGFBP2*, *PITPNC1*, *MERTK*, *SDF1*) et associées à des fonctions pour

ce microARN dans le blocage de la croissance tumorale ou dans l'inhibition de la formation de métastase. Cependant, le rôle de miR126 dans l'endothélium tumoral n'est pas établi à ce jour.

EGFL7 et miR126 : fonctions convergentes sur l'activation de l'endothélium

Il a été proposé qu'un gène hôte et ses microARN introniques participent aux mêmes processus biologiques afin de générer une cohérence fonctionnelle. *EGFL7* et miR126 ne sont pas actuellement associés aux mêmes fonctions biologiques au cours du développement vasculaire embryonnaire ou postnatal mais ils régulent tous deux l'expression des CAM par les cellules endothéliales. En effet, comme évoqué précédemment pour *EGFL7*, miR126-3p inhibe l'expression de *VCAM-1* dans les cellules endothéliales, agissant alors en synergie avec *EGFL7* sur le contrôle de l'activation endothéliale [16]. Récemment, nous avons établi que miR126-5p participe également au contrôle de ce processus (publication sous presse).

EGFL7 et ses deux microARN introniques fonctionnent donc de concert pour réprimer l'activation de l'endothélium et représentent ainsi des cibles potentielles pour contrôler ce processus biologique non seulement au cours de la tumorigenèse mais également au cours de l'inflammation.

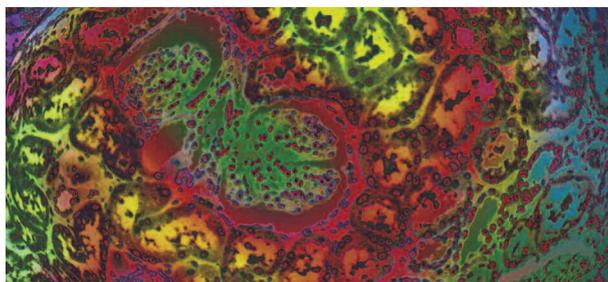
De nombreuses questions sont encore en suspens, notamment en ce qui concerne les mécanismes moléculaires qui permettent à *EGFL7* d'assurer ses diverses fonctions (figure 1). Nous travaillons actuellement sur les différentes localisations possibles d'*EGFL7* dans la matrice extracellulaire et leur impact sur les fonctions

de cette protéine. L'identification des partenaires protéiques d'*EGFL7* lui permettant de s'accumuler dans la matrice extracellulaire pour y réguler l'activité des lysyl-oxydases, l'expression des CAM ou la cascade Notch sera essentielle à ces études.

Liens d'intérêts : L'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Soncin F, et al. *EMBO J* 2003 ; 22 : 5700-11.
2. Parker LH, et al. *Nature* 2004 ; 428 : 754-8.
3. Campagnolo L, et al. *Am J Pathol* 2005 ; 167 : 275-84.
4. Campagnolo L, et al. *Gene Exp Patterns GEP* 2008 ; 8 : 389-96.
5. Schmidt MHH, et al. *Nat Cell Biol* 2009 ; 11 : 873-80.
6. Nikolic I, et al. *Blood* 2013 ; 121 : 3041-50.
7. Lelièvre E, et al. *EMBO J* 2008 ; 27 : 1658-70.
8. Schmidt M, et al. *Development* 2007 ; 134 : 2913-23.
9. Kuhnert F, et al. *Development* 2008 ; 135 : 3989-93.
10. Nichol D, et al. *Blood* 2010 ; 116 : 6133-43.
11. Delfortrie S, et al. *Cancer Res* 2011 ; 71 : 7176-86.
12. Badiwala MV, et al. *Circulation* 2010 ; 122 : S156-161.
13. Charpentier MS, et al. *Dev Cell* 2013 ; 25 : 132-43.
14. Wang S, et al. *Dev Cell* 2008 ; 15 : 261-71.
15. Fish JE, et al. *Dev Cell* 2008 ; 15 : 272-84.
16. Harris TA, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 1516-21.



Directeur de la publication : Gilles Cahn • **Rédacteurs en chef :** Bernard Lévy, Jacques Robert • **Comité de rédaction :** Eric Dansin, Gaël Deplanque, Anne Floquet, Joseph Gligorov, David Malka, Emmanuel Mitry • **John Libbey Eurotext** 127, avenue de la République, 92120 Montrouge, France - Tél. : 01 46 73 06 60
• **Secrétaire de rédaction :** Fanny Biancale • 4 numéros par an, Tarif France 40 € Autres tarifs : contacts@jle.com

Impression : Corlet Imprimeur SA - 14110 Condé-sur-Noireau. Revue trimestrielle (4 numéros par an). Ne peut être vendu séparément. ISSN : 1951-2252 - ISSN (en ligne) : 2105-2336. Dépôt légal : à parution. © **John Libbey Eurotext - Commission paritaire : en cours**