

Les intégrines et l'angiogénèse

Jacques Robert

Université de Bordeaux et Institut Bergonié, Bordeaux

<JRobert@bergonie.org>

A la fois molécules d'adhésion et de signalisation, les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires des molécules de la matrice extracellulaire et se lient, au niveau intracellulaire, à des protéines associées au cytosquelette d'actine. Les intégrines jouent ainsi un rôle important dans la motilité cellulaire en contrôlant les forces de traction de la cellule dans le stroma et en « interrogeant » une structure hétérodimérique, associant une chaîne alpha et une chaîne bêta. Un total de 18 chaînes α et 8 chaînes β servent à constituer 24 intégrines différentes, autant dire 24 chapitres distincts d'un ouvrage sur la signalisation cellulaire qui se voudrait exhaustif. Certaines intégrines jouent un rôle important dans la thrombose et l'immunité et leur ciblage pharmacologique dans ces indications a fait l'objet de nombreux travaux. Elles sont impliquées dans le développement des cancers en raison de leur rôle d'une part dans les cellules tumorales (développement des métastases) et, d'autre part, dans les cellules endothéliales (angiogénèse). Une dizaine d'intégrines distinctes sont impliquées dans l'oncogénèse et le développement des cancers ; certaines ont un effet pronocogénique, comme les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_6\beta_4$, d'autres un effet anti-oncogénique comme $\alpha_2\beta_1$.

Les intégrines ont une structure hétérodimérique, associant une chaîne alpha et une chaîne bêta. Un total de 18 chaînes α et 8 chaînes β servent à constituer 24 intégrines différentes, autant dire 24 chapitres distincts d'un ouvrage sur la signalisation cellulaire qui se voudrait exhaustif. Certaines intégrines jouent un rôle important dans la thrombose et l'immunité et leur ciblage pharmacologique dans ces indications a fait l'objet de nombreux travaux. Elles sont impliquées dans le développement des cancers en raison de leur rôle d'une part dans les cellules tumorales (développement des métastases) et, d'autre part, dans les cellules endothéliales (angiogénèse). Une dizaine d'intégrines distinctes sont impliquées dans l'oncogénèse et le développement des cancers ; certaines ont un effet pronocogénique, comme les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_6\beta_4$, d'autres un effet anti-oncogénique comme $\alpha_2\beta_1$.

Données structurales

La majeure partie des intégrines fait saillie à la surface de la membrane et seule une petite partie est intracellulaire ; la partie extracellulaire peut adopter une configuration repliée susceptible, sous l'effet de certains signaux en provenance de l'intérieur de la cellule, de se déplier, dévoilant ainsi des sites d'interaction avec la matrice extracellulaire. Les chaînes α comportent un domaine *propeller* (propulseur) fait de 7 séquences organisées comme les pales d'une hélice, supporté par un corps constitué d'une cuisse

(*thigh*), d'un genou (*genu*) et de deux mollets (*calf*) (figure 1). Certaines contiennent également, au cœur du propulseur, un domaine αI d'interaction avec la matrice. Les chaînes β comportent toutes un domaine βI d'interaction avec la matrice inséré entre des domaines d'hybridation, des domaines présentant une homologie avec la structure de l'EGF et un domaine de queue (β -tail). Chaque intégrine est capable de reconnaître des ligands bien définis au niveau des protéines de la matrice extracellulaire : collagènes, laminines, fibronectine, vitronectine, métalloprotéinases, angiostatine, etc. Les domaines d'interaction ont été très étudiés sur le plan structural : ils sont susceptibles d'interagir avec des séquences précises d'acides aminés ; par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sans doute la mieux connue, reconnaît le motif Arg-Gly-Asp (RGD) sur la fibronectine et quelques autres protéines. Cette reconnaissance met en jeu en particulier, dans le domaine βI de l'intégrine, une séquence appelée MIDAS (*Metal ion-dependent adhesion site*) permettant la fixation d'un ion Ca^{2+} qui interagit avec l'acide aspartique du motif RGD.

Au niveau intracellulaire, les intégrines, sans être directement liées à l'actine, sont associées à des protéines régulant la motilité au niveau du cytosquelette, en particulier la taline au niveau de la chaîne β et la paxilline à celui de la chaîne α , qui servent de plates-formes pour les interactions avec de nombreuses autres protéines : kindline, tensine, vinculine, actinine, filamine, parvine, cofiline, etc. Les liens ainsi créés entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette se concentrent au niveau de contacts focaux (figure 2) constitués par l'agrégation (*clustering*) des molécules d'intégrines, qui réalisent ainsi des points d'attachement de la cellule au stroma. À l'aspect qualitatif (affinité) de l'interaction intégrine – matrice s'ajoute l'aspect quantitatif (avidité) lié au nombre de molécules d'intégrines participant aux contacts focaux.

Données fonctionnelles

Les intégrines sont impliquées dans une signalisation bidirectionnelle : une signalisation *inside-out*, partant de messages

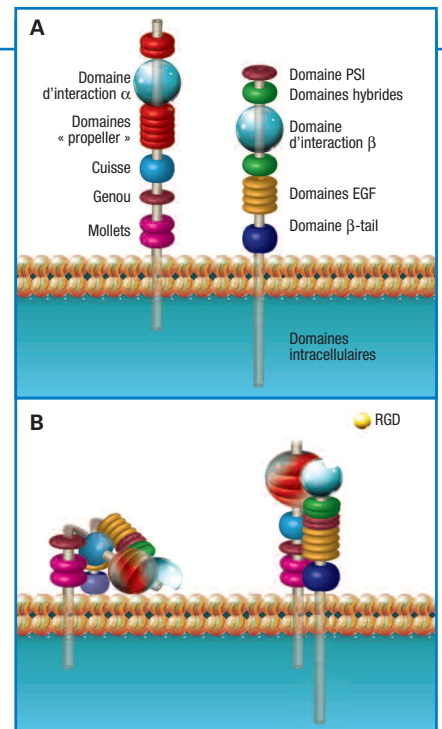


Figure 1. Structure des intégrines et conformation dans l'espace des chaînes α et β .

A. Représentation des domaines peptidiques caractéristiques des chaînes α et β . Le domaine αI d'interaction avec la matrice extracellulaire n'est pas présent sur toutes les chaînes α .

B. Représentation dans l'espace des intégrines. Les domaines *propeller* des chaînes α sont organisés en une partie globulaire, la tête ; les domaines βI sont exposés par le repliement des domaines hybrides. À gauche, les intégrines adoptent une conformation repliée en absence de stimulation ; à droite, sous l'effet d'une stimulation intracellulaire, les intégrines prennent une conformation dépliée, démasquant un site de liaison avec les sites RGD de la matrice extracellulaire, ce qui permet une interaction avec les domaines cytoplasmiques et la génération d'un signal.

intracellulaires activant les intégrines en les redressant et en démasquant leurs sites récepteurs ; et une signalisation *outside-in* permettant à la cellule de recevoir et de transmettre des consignes de prolifération ou de survie en fonction de son attachement à la matrice extracellulaire. Cette signalisation (figure 3) fait intervenir des kinases spécialisées, comme l'ILK (*Integrin-linked kinase*) ou la FAK (*Focal adhesion kinase*). La formation de contacts focaux est à l'origine de l'activation de cette dernière, une tyrosine kinase cytoplasmique capable de s'auto-phosphoryler et d'activer en cascade d'autres voies de signalisation comme la voie des MAP kinases ou la voie de la PI3 kinase, ou encore de recruter des protéines d'échange GDP/GTP qui activent des petites protéines G comme RHO capables d'activer à leur tour des kinases agis-

sant sur les protéines du cytosquelette. Les messages intracellulaires permettant l'activation des intégrines et leur « redressement » proviennent en particulier des récepteurs à activité tyrosine kinase. C'est ainsi que l'ILK, une sérine/thréonine kinase,

possède un domaine PH de reconnaissance du phosphate en 3 du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. Ainsi activée par la PI3 kinase, elle phosphoryle la sous-unité β des intégrines, ce qui entraîne des modifications de conformation modu-

lant l'activité réceptrice des intégrines au niveau extracellulaire. Elle a également pour substrats de son activité kinase certaines protéines des contacts focaux ; elle active également, elle aussi, des facteurs d'échange GTP/GDP de petites protéines G impliquées dans le contrôle du cytosquelette, comme RAC1 et CDC42. Certaines intégrines se comportent comme des récepteurs à dépendance : en absence de ligand, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ entraîne l'apoptose, condamnant ainsi à la mort les cellules qui échapperaient à leur environnement stromal. Ce phénomène, appelé *integrin-mediated death* (IMD) est assuré par l'activation de la caspase 8 qui se produit lorsque l'intégrine n'est pas liée à un de ses ligands extracellulaires. La perte de cette propriété serait un facteur favorisant la métastase des cellules normalement attachées à la matrice extracellulaire.

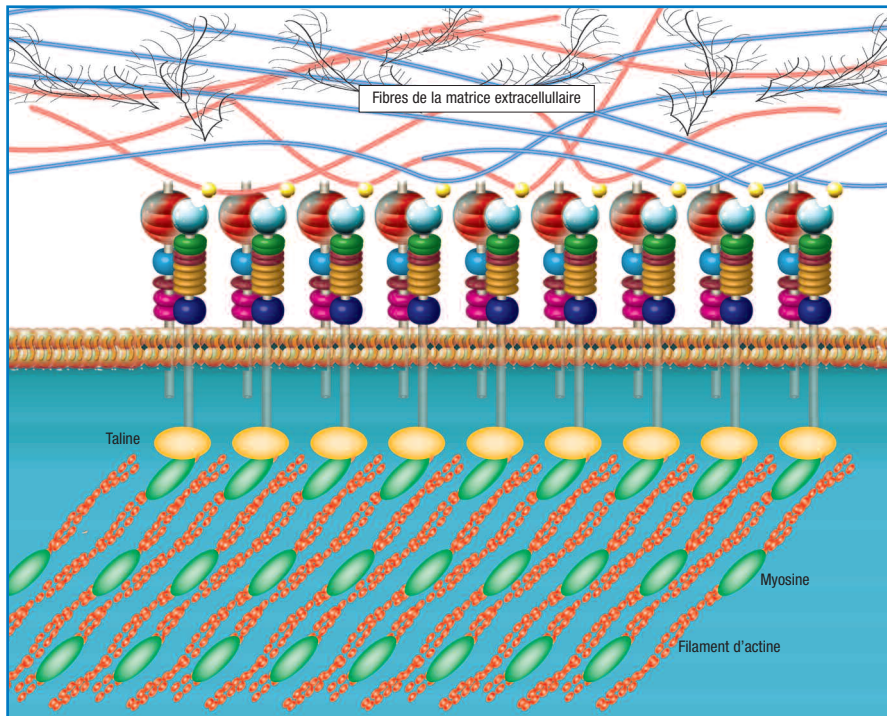


Figure 2. Représentation d'un « contact focal ». Les contacts focaux résultent du regroupement des molécules d'intégrines pour former des clusters, attachés, d'une part, à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire des sites RGD et, d'autre part, au cytosquelette intracellulaire d'actine et de myosine via des protéines intracellulaires associées comme la taline.

Intégrines et angiogénèse

Il existe une parenté évidente entre les phénomènes d'adhésion – migration des cellules tumorales (métastase) et celle des cellules endothéliales (angiogénèse). La vasculogénèse et l'angiogénèse physiologiques dépendent de l'interaction des cellules endothéliales avec la fibronectine et la vitronectine. L'implication des diverses intégrines dans l'angiogénèse a pu être étudiée à l'aide de modèles génétiques *in vivo* comme le *knock in* et l'invalidation des gènes des diverses chaînes, ainsi qu'à l'aide d'antagonistes plus

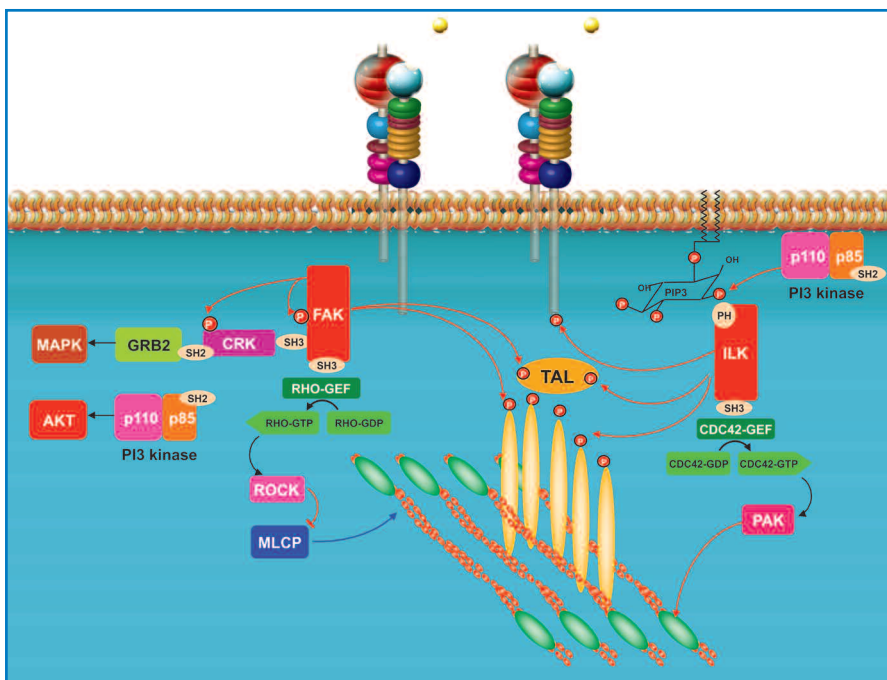


Figure 3. Signalisation via les intégrines. Deux voies de signalisation impliquant les intégrines sont représentées :

– à droite, l'ILK (*Integrin-linked kinase*), recrutée par exemple par la PI3 kinase activée par un récepteur à activité tyrosine kinase, phosphoryle la sous-unité β des intégrines ainsi que certaines protéines des contacts focaux ; elle active également les facteurs d'échange GEF de petites protéines G de la famille RHO, comme CDC42, qui, une fois activées, peuvent activer à leur tour des kinases comme PAK (*p21-activated kinase*) qui interviennent directement sur le cytosquelette ;

– à gauche, la FAK (*Focal adhesion kinase*), recrutée par activation des intégrines, phosphoryle des protéines des contacts focaux, ainsi que des kinases cytoplasmiques de la famille SRC comme CRK (*CT10 virus activator of kinase*) ; des protéines adaptatrices sont capables d'activer les voies de prolifération comme la voie AKT et la voie des MAP kinases. La FAK active également, via un GEF, des petites protéines G de la famille RHO qui, une fois activées, peuvent activer à leur tour des kinases comme ROCK (*RHO-activated kinase*) capables d'agir directement sur le cytosquelette via une phosphatase comme MLCP (*Myosin light chain phosphatase*).

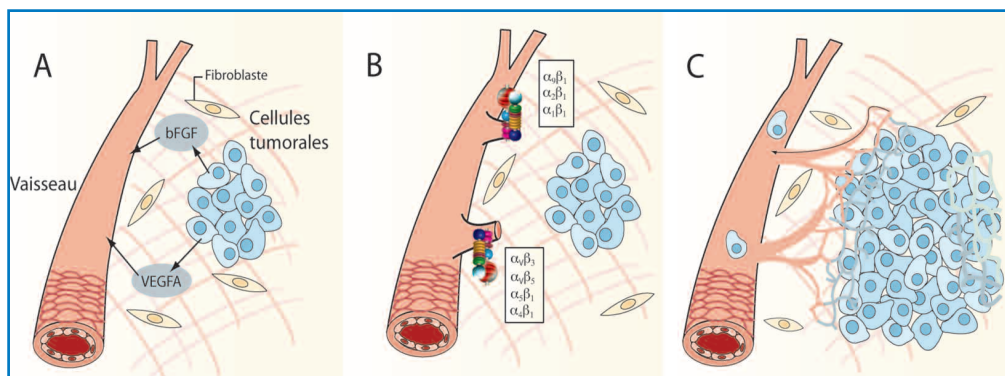


Figure 4. Rôle des intégrines dans l'angiogenèse. **A.** Les cellules tumorales sécrètent dans le milieu extracellulaire des facteurs de croissance pour les cellules endothéliales comme le VEGF, le bFGF et le PDGF. **B.** En réponse à ces facteurs pro-angiogènes sécrétés par les cellules tumorales, les cellules endothéliales expriment des intégrines qui interagissent avec la matrice extracellulaire pour leur permettre de migrer et de coloniser la tumeur. **C.** La production de vaisseaux intratumoraux permet alors aux cellules tumorales de proliférer.

ou moins spécifiques. Des résultats souvent ambigus, voire contradictoires, ont été obtenus, en raison du fait que la même intégrine peut jouer des rôles différents lors des étapes du développement embryonnaire et tumoral, et après stabilisation des arbres vasculaires. En outre, la participation de chaînes identiques, en particulier α_v et β_1 , à la structure d'intégrines distinctes, entraîne une difficulté particulière pour l'interprétation des résultats.

Le mécanisme général (et outrageusement simplifié) du rôle des intégrines dans l'angiogenèse tumorale est représenté sur la figure 4 : les cellules endothéliales expriment des intégrines en réponse à des facteurs pro-angiogènes sécrétés par les cellules tumorales ; la liaison de ces intégrines à divers ligands de la matrice extracellulaire permet les phénomènes de prolifération et/ou de migration des cellules endothéliales qui contribuent, de façon séquentielle, à la formation et à la maturation des vaisseaux. La variété des stimuli en provenance de la tumeur, la diversité des intégrines produites pour répondre à ces stimuli, et la nature des ligands reconnus par les intégrines expliquent pourquoi nous n'avons encore qu'une vue imparfaite de l'ensemble du paysage. Seuls quelques points clés seront décrits ci-dessous.

Les chaînes α_v des intégrines peuvent s'associer avec diverses chaînes β . L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, dotée d'un domaine de reconnaissance du motif RGD présent en particulier sur la fibronectine, est beaucoup plus abondante dans les vaisseaux tumoraux ou dans les régions inflammatoires que dans les vaisseaux des tissus normaux. Son expression est stimulée par divers facteurs angiogènes comme le bFGF et est mise en œuvre lors des phénomènes de cicatrisation et d'inflammation ; il a été suggéré que l'inflammation serait à l'origine du *switch* angiogénique des tumeurs. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue ainsi un rôle clé dans la migration et la survie des cellules endothéliales. Ses antagonistes entraînent l'apoptose des cellules endo-

théliales *in vitro* comme *in vivo*. Très proche de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur le plan structural, l'intégrine $\alpha_v\beta_5$, dont le ligand principal est la vitronectine, dépourvue de motifs RGD, est induite par le VEGF et non par le bFGF et interviendrait donc à une autre étape de l'angiogenèse ; tout autant que celui de l' $\alpha_v\beta_3$, son ciblage pourrait se révéler intéressant en thérapeutique.

L'intégrine $\alpha_5\beta_1$ a un comportement assez proche de celui de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: son ligand principal est la fibronectine et son expression est stimulée par le bFGF et non par le VEGF, alors que l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ est stimulée par le VEGF et le bFGF. Cette dernière a pour ligand la fibronectine ainsi que le VCAM (*Vascular cell adhesion molecule*), qui permet l'attachement des cellules endothéliales et des péricytes aux cellules musculaires lisses qui expriment cette protéine d'adhésion à leur surface. On comprend ainsi que les antagonistes de l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ aient un puissant effet anti-angiogène.

Les intégrines $\alpha_1\beta_1$ et $\alpha_2\beta_1$ reconnaissent principalement les laminines. Leur expression dans les cellules endothéliales est induite par les VEGF-A et C, ce qui implique un rôle dans l'angiogenèse des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Des souris ayant un knock-out des gènes des chaînes α_1 ou α_2 sont viables ; le développement tumoral est ralenti chez les souris n'exprimant pas l'intégrine $\alpha_1\beta_1$ mais au contraire accéléré chez celles n'exprimant pas l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. Cela suggère des rôles opposés de ces deux intégrines dans l'angiogenèse tumorale.

Conclusion

Les intégrines, *Janus bifrons* regardant et attachant l'une à l'autre la matrice extracellulaire et le cytosquelette, jouent un rôle majeur et complémentaire dans la métastase et l'angiogenèse en raison de leur expression dans les cellules tumorales comme dans les cellules endothéliales. Si leur rôle majeur direct concerne le contrôle de l'ad-

hésion et de la motilité, leurs liens avec les outils de commande de la survie et de la prolifération cellulaire en font des acteurs majeurs de la vie sociale des cellules, dont tous les aspects sont encore loin d'être déchiffrés. Les interventions thérapeutiques peuvent se concevoir à trois niveaux : (i) celui de leurs interactions avec leurs ligands comme le motif RGD ; (ii) celui de l'inhibition des systèmes de signalisation d'aval (ILK, FAK) ; celui du contrôle de leur expression. À l'heure actuelle, plusieurs succès thérapeutiques ont été enregistrés dans le domaine de la thrombose et de l'immunité ; dans le domaine du cancer et de l'angiogenèse, une molécule en développement a atteint les essais de phase III, le cilengitide, dont il a été question dans un précédent numéro de *VEGF Actu*. Des anticorps thérapeutiques sont en plein développement et font l'objet d'essais cliniques : l'etaracizumab dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le volociximab contre l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. Nous aurons sûrement l'occasion d'y revenir dans de prochains numéros !

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

- Avraamides CJ, et al. *Nat Rev Cancer* 2008 ; 8 : 604-17.
- Contois L, et al. *Semin Cancer Biol* 2009 ; 19 : 318-28.
- Cox D, et al. *Nat Rev Drug Discov* 2010 ; 9 : 804-20.
- Desgrosellier JS, et al. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 9-22.
- Gahmberg CG, et al. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1790 : 431-44.
- Harburger DS, et al. *J Cell Sci* 2009 ; 122 : 159-63.
- Heglans S, et al. *Biochim Biophys Acta* 2007 ; 1775 : 163-80.
- Rathinam R, et al. *Cancer Metastasis Rev* 2010 ; 29 : 223-37.
- Serini G, et al. *Exp Cell Res* 2006 ; 312 : 651-8.
- Somanath PR, et al. *Cell Biochem Biophys* 2009 ; 53 : 53-64.