

# Les voies de signalisation cellulaire des facteurs angiogènes

Jean-Jacques Feige

Laboratoire Biologie du cancer et de l'infection, Inserm U1036, Institut de recherche en sciences et technologies pour le vivant, CEA Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble <Jean-jacques.feige@cea.fr>

L'angiogenèse est un processus biologique complexe contrôlé par une panoplie de facteurs de croissance sécrétés dans leur environnement extracellulaire et agissant de façon paracrine sur les vaisseaux environnants. Que ce soit dans les tissus en développement au cours de l'embryogenèse ou dans les tumeurs cancéreuses lors de la néo-angiogenèse tumorale, les mêmes facteurs transmettent leurs signaux de croissance, de migration ou de survie cellulaire par l'intermédiaire des mêmes récepteurs membranaires situés dans la membrane plasmique des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses. Cette revue a pour objet de décrire de façon synthétique et simplifiée les principaux systèmes de signalisation angiogénique connus à ce jour.

Le concept de facteur de croissance protéique agissant de façon autocrine, paracrine ou endocrine, a été établi par les travaux pionniers de caractérisation du NGF (*nerve growth factor*) et de l'EGF (*epidermal growth factor*) par Cohen et Levi-Montalcini [1]. C'est en suivant des hypothèses similaires que Folkman postula dès les années 1970 l'existence des TAF (*tumor angiogenic factors*), ce qui conduisit à l'identification initiale des facteurs angiogènes FGF-1 et -2 (*fibroblast growth factors -1 et -2*) [2], puis, quelques années plus tard, à celle du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) [3, 4]. Tout comme ceux du NGF et de l'EGF, les récepteurs de ces facteurs de croissance endothéliale se révélèrent être des protéines transmembranaires douées d'activité protéine-tyrosine kinase.

## Les étapes cellulaires de l'angiogenèse

Depuis ces travaux pionniers, notre compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse s'est enrichie de nouvelles molécules et de nouveaux mécanismes de régulation. Alors que dans les années 1980 notre

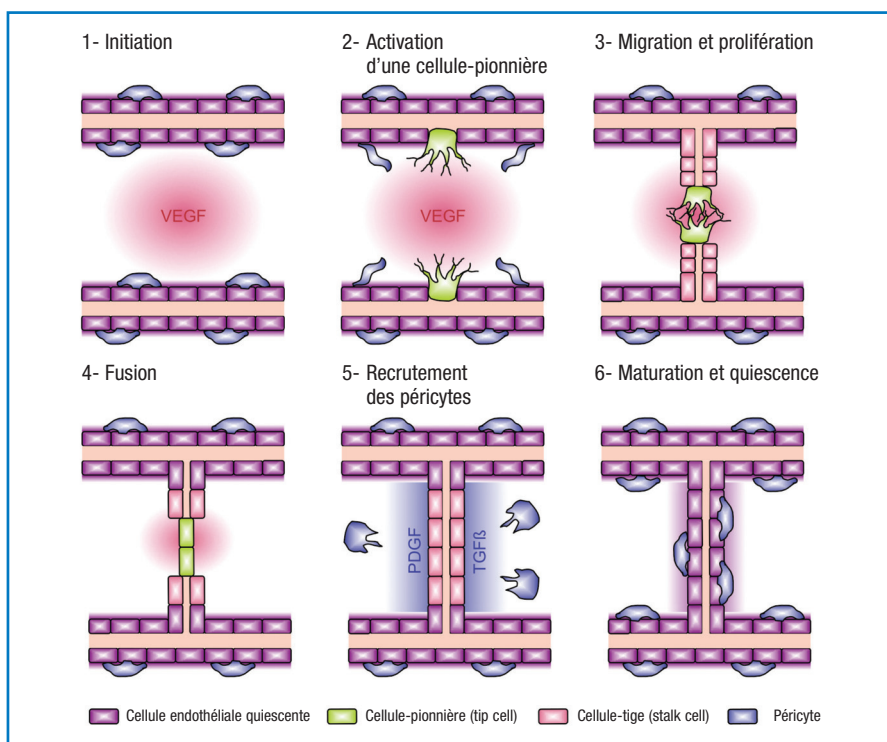
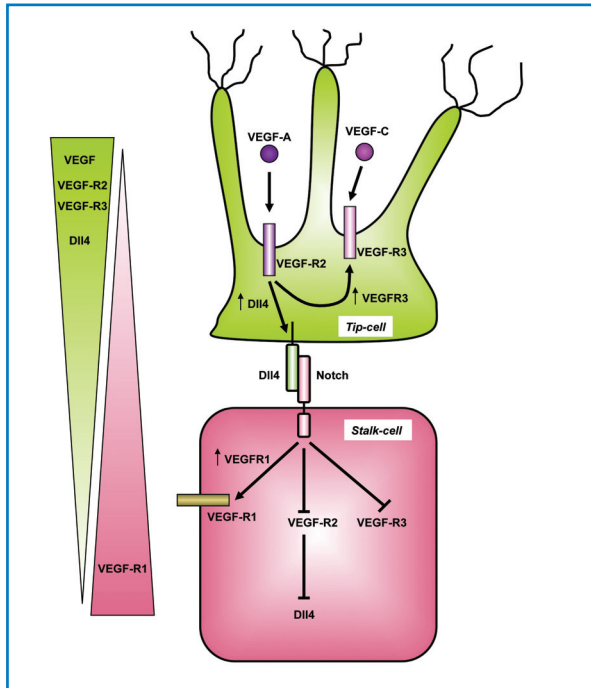


Figure 1. Les principales étapes de l'angiogenèse.

vision de l'angiogenèse était réduite à la prolifération des cellules endothéliales, nous savons maintenant que la construction d'un nouveau capillaire sanguin à partir d'un réseau vasculaire préexistant nécessite deux grandes étapes complémentaires aussi indispensables l'une que l'autre (figure 1) : une phase d'activation et une phase de maturation.

Le processus est initié par une étape d'activation au cours de laquelle des facteurs angiogènes tels que les membres de la famille du VEGF se lient à leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales et induisent la sécrétion de protéases permettant la dégradation de la membrane basale du vaisseau. Ils stimulent aussi la migration des cellules endothéliales activées dans l'espace matriciel dégradé et leur prolifération. Très rapidement, une

hiérarchie s'établit au sein des cellules activées avec l'engagement d'une cellule vers un phénotype « tip-cell » (cellule de pointe) émettant des filopodes et migrant dans la matrice dégradée tout en « palpant » son environnement. Les cellules au contact de la tip-cell adoptent alors un phénotype différent, appelé « stalk-cell » (cellule organisée en tige), restant alignées et jointives derrière la tip-cell et allongeant progressivement le bourgeon vasculaire par le biais de divisions mitotiques. Cette spécification cellulaire est contrôlée par le système Notch/Dll4 (figure 2). La cellule-pionnière surexprime Dll4 en réponse au VEGF. En se liant aux récepteurs Notch de la cellule-tige à son contact, Dll4 réprime l'expression du récepteur 2 du VEGF (VEGF-R2), diminuant ainsi la réponse de type migra-



**Figure 2.** La signalisation Dll4/Notch dans la spécification des « tip cells ».

toire. La cellule-tige s'engage alors dans une réponse mitogène. Le système Notch-Dll4 agit ainsi comme un régulateur très fin de la ramification vasculaire [5]. Lorsque deux bourgeons vasculaires se rencontrent, ils établissent une jonction par des mécanismes encore peu connus qui conduisent *in fine* à la formation d'une nouvelle anastomose microvasculaire.

La seconde phase de l'angiogenèse est l'étape de maturation qui a pour but de reconstituer une membrane basale autour des nouveaux capillaires et de leur assurer une couverture péricytaire qui permettra *in fine* aux cellules endothéliales de survivre plusieurs mois dans un état de quiescence en absence de VEGF environnant. Les acteurs majeurs de cette phase de maturation sont PDGF (*platelet-derived growth factor*), TGF $\beta$ , angiopoïétine-1 et, le dernier caractérisé, BMP9 (*bone morphogenetic protein 9*).

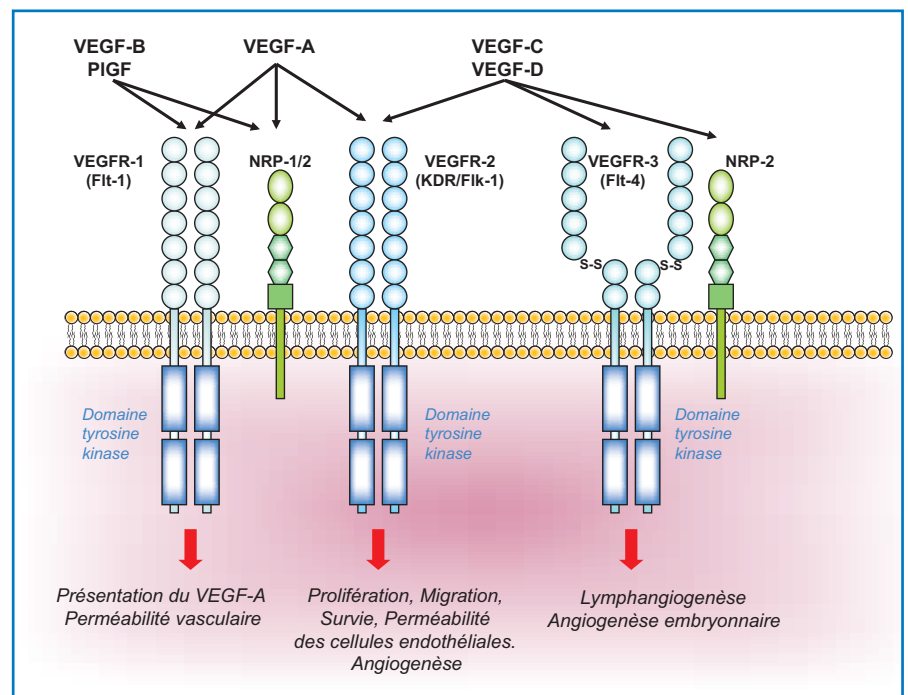
## Les voies de signalisation cellulaire des facteurs angiogènes

La famille du VEGF (*figure 3*) est composée de plusieurs membres (VEGF-A, VEGF-B, PlGF, VEGF-C, VEGF-D) dont le plus étudié est le VEGF-A [6]. Tous les membres de cette famille agissent par l'intermédiaire de récepteurs membranaires à activité protéine-tyrosine kinase possédant un seul domaine transmembranaire. Trois récepteurs distincts ont été caractérisés : VEGF-R1/Flt-1, VEGF-R2/Flk-1 et VEGF-R3/Flt-4. Leur patron d'expression

et leurs fonctions respectives sont clairement distincts. VEGF-R1 et VEGF-R2 sont exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins alors que VEGF-R3, au stade adulte, est exprimé dans les vaisseaux lymphatiques. Les effets biologiques médiés respectivement par VEGF-R1 et VEGF-R2 font l'objet de débats qui ne sont toujours pas clos comme en témoi-

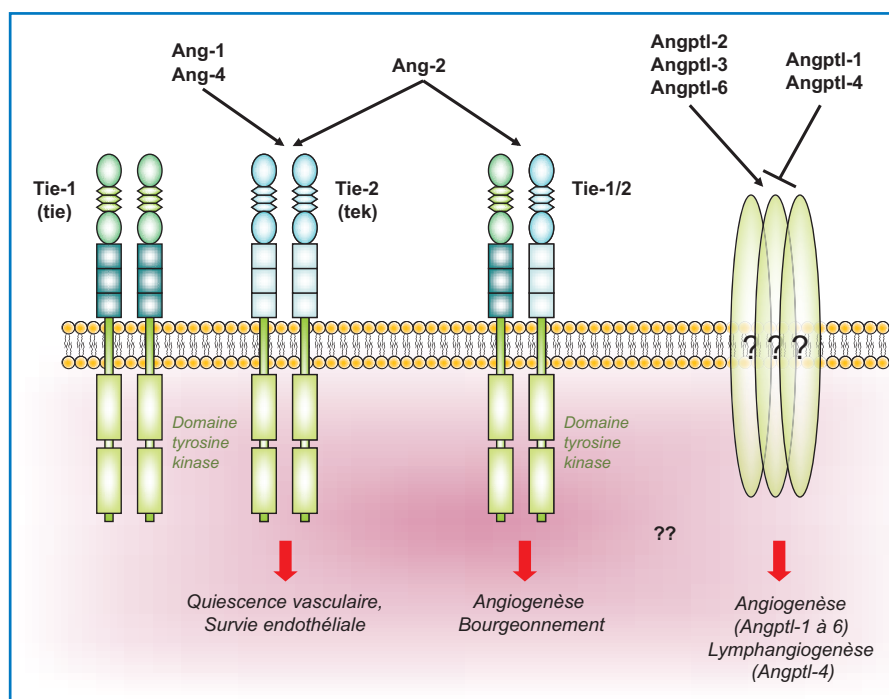
gne un numéro récent de la revue *Cell* dans lequel l'équipe de Ferrara prétend que PlGF, un ligand spécifique de VEGF-R1, n'est absolument pas impliqué dans l'angiogenèse tumorale alors que celle de Carmeliet démontre une efficacité des anti-PlGF dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale et oculaire [7, 8]. Le consensus le plus généralement admis est que VEGF-R2 est capable à lui seul d'induire tous les effets biologiques du VEGF-A, alors que VEGF-R1 serait plutôt un co-récepteur favorisant l'action du VEGF, en particulier sur la perméabilité vasculaire. VEGF-R3 est quant à lui très clairement impliqué dans l'angiogenèse lymphatique, puisque des mutations de ce récepteur sont associées à des pathologies lymphœdémateuses [9]. Les neuropilines 1 et 2 sont des co-récepteurs des VEGF qui ne transduisent pas de message biologique par eux-mêmes mais qui potentialisent la liaison des VEGF sur leurs récepteurs à activité tyrosine kinase.

Les angiopoïétines (Ang) représentent une seconde classe de facteurs pro- et anti-angiogènes agissant également par l'intermédiaire d'un récepteur à activité tyrosine kinase, le récepteur Tie-2 (*figure 4*). Ang1 et Ang2 furent identifiées en 1996-97 comme les ligands physiologiques du récepteur Tie-2 mais dont l'un (Ang-1) est agoniste et l'autre (Ang-2) antagoniste [10, 11]. Ang4 et son orthologue chez la souris, Ang3, ont été identifiés plus tard,



**Figure 3.** La signalisation de la famille des VEGF.

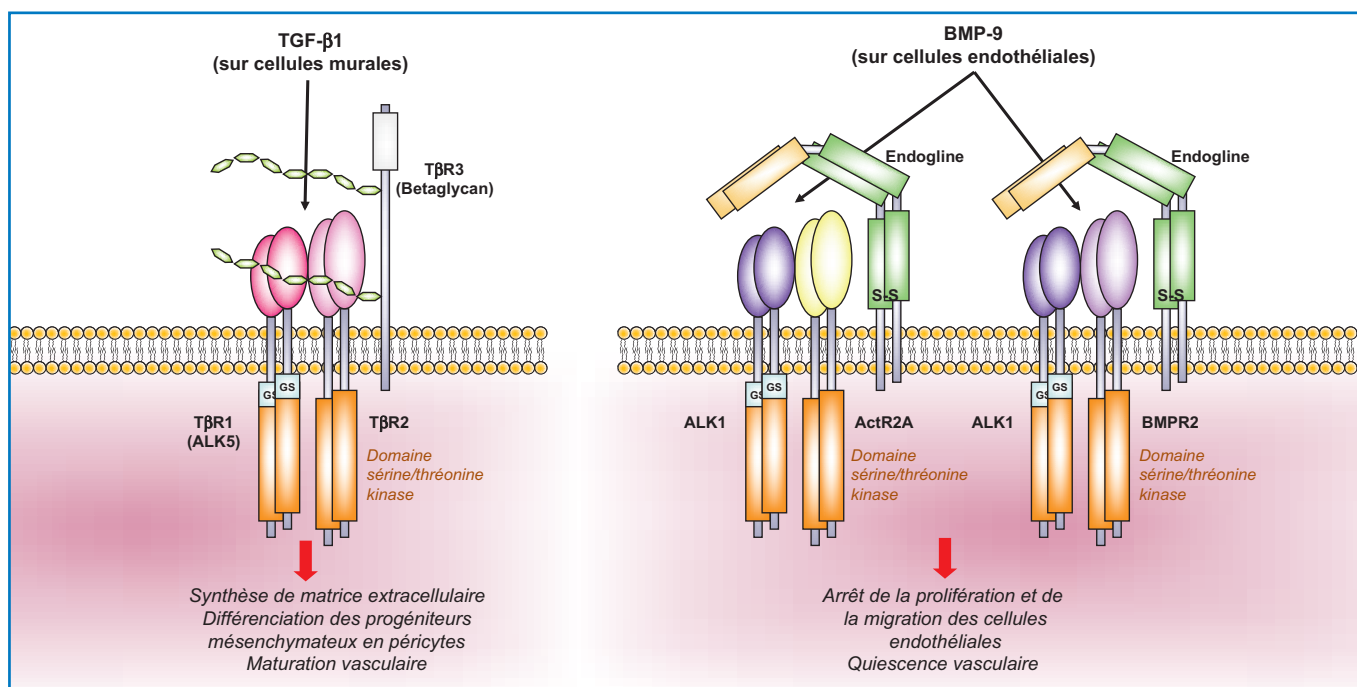
de même qu'une famille de 7 protéines apparentées, désignées Angptl-1 à Angptl-7 (*angiopoietin-like proteins*). Les récepteurs des Angptl ne sont pas connus à l'heure actuelle, bien que l'implication de ces facteurs dans l'angiogenèse et le métabolisme glucidique et lipidique soit bien caractérisée [12]. Ang-1 et Ang-4 sont des agonistes du récepteur Tie-2 qui activent son autophosphorylation et la phosphorylation de la protéine kinase Akt, tandis qu'Ang2 et Ang3 sont, selon le contexte cellulaire, des agonistes ou des antagonistes. Cette activation d'Akt conduit à la phosphorylation du facteur de transcription FOXO-1 (*Forkhead box O1*) et favorise la quiescence et la survie des cellules endothéliales [13]. Ang-1 est exprimée de façon constitutive par de nombreux types cellulaires. Ang-2 est très faiblement exprimée dans l'endothélium quiescent mais très fortement induit en réponse aux facteurs VEGF, FGF-2 et à l'hypoxie. L'induction de l'expression d'Ang-2 est un signal important de la phase d'activation de l'angiogenèse, conduisant à la dissociation des jonctions inter-endothéliales, un prérequis à la migration de ces cellules. Au contraire, dans la phase de maturation de l'angiogenèse et dans l'endothélium quiescent, l'expression constitutive d'Ang-1 et la phosphorylation constitutive de Tie-2 favorisent la survie endothéliale et le maintien des jonctions intercellulaires [13, 14]. Une étude récente a élucidé le rôle biologique



**Figure 4.** La signalisation de la famille des angiopoïétines.

que de Tie-1 resté longtemps mystérieux [15]. Dans les cellules qui n'expriment que Tie-2, toutes les angiopoïétines favorisent la dimérisation du récepteur et son activation. Par contre, dans les cellules qui expriment Tie-1 et Tie-2, ces récepteurs forment des hétérodimères qui inactivent l'activité biologique de Tie-2. La

liaison d'Ang-1 induit la dissociation de ce complexe et la formation d'homodimères de Tie-2 actifs. Par contre, la liaison d'Ang-2 stabilise cet hétérocomplexe et empêche la liaison d'Ang-1, résultant dans un effet antagoniste d'Ang-1. Ces données récentes sont schématisées sur la figure 4.



**Figure 5.** La signalisation de la famille des TGFβ.

Le PDGF, initialement purifié des plaquettes sanguines, est un facteur dimérique produit par des nombreux types cellulaires. Les progrès de la génomique ont permis d'identifier 4 gènes PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D, permettant l'expression de plusieurs homodimères et hétérodimères (AA, AB, BB, CC, DD) [16]. Les PDGF exercent leurs effets biologiques *via* deux récepteurs à activité tyrosine kinase PDGFR- $\alpha$  et PDGFR- $\beta$ . *In vivo*, PDGFR- $\alpha$  agit comme récepteur des PDGF-AA et -CC et PDGFR- $\beta$  comme celui du PDGF-BB [16]. Les cellules endothéliales expriment PDGF-BB, alors que les péricytes et les cellules de muscle lisse vasculaires expriment le récepteur PDGFR- $\beta$ , permettant ainsi une action paracrine du PDGF-BB. PDGF-BB favorise le recrutement de progéniteurs mésenchymateux, leur différenciation en péricytes et leur accollement sur les néovaisseaux, étape indispensable à leur stabilisation en absence de VEGF (phase de maturation) [17].

Le TGF $\beta$  est une cytokine multifonctionnelle et un puissant inducteur de la fibrose. Une très grande famille de peptides dimériques apparentés au TGF $\beta$  est maintenant bien caractérisée. Elle comprend trois TGF $\beta$  et plusieurs sous-familles de protéines morphogènes (BMP, GDF, nodal ...). Les membres de la famille du TGF $\beta$  signalisent *via* un complexe hétéromérique de récepteurs transmembranaires de type I et de type II à activité sérine/thréonine kinase. Différentes combinaisons de ces récepteurs conduisent à la spécificité de liaison des différents ligands [18] (figure 5). Dans les cellules endothéliales, un récepteur de type III dépourvu d'activité sérine-thréonine kinase, l'endogline, s'associe au complexe de récepteurs I et II et favorise l'effet biologique du

ligand. La liaison des membres de la famille du TGF $\beta$  à leurs récepteurs induit la phosphorylation de facteurs de transcription intracellulaires, les protéines Smad 2 et 3 pour la sous-famille du TGF $\beta$  ou les protéines Smad 1 et 5 pour la sous-famille des BMP [19]. La fonction majeure du TGF $\beta$  dans l'angiogenèse se situe dans la phase de maturation. Le TGF $\beta$  latent stocké à la surface des cellules endothéliales peut être activé par les cellules précurseurs des péricytes recrutés *via* le PDGF [20]. Le TGF $\beta$  ainsi produit se lie sur le récepteur T $\beta$ RI (ALK5) des progéniteurs mésenchymateux et stimule leur différenciation en cellules murales.

Contrairement au récepteur T $\beta$ RI/ALK5, dont l'expression est ubiquiste, le récepteur ALK1, qui signale *via* les SMAD 1 et 5, présente une expression restreinte à l'endothélium vasculaire. Notre laboratoire a récemment identifié deux ligands du récepteur ALK1 appartenant à la famille des BMP, BMP-9 et BMP-10 [22]. BMP-9, en se liant à un complexe de récepteurs composé d'ALK1, BMPRII ou activine RIIA et endogline, médie un signal de quiescence vasculaire [23]. BMP-9 semble donc, au même titre que l'angiopoïétine 1, le PDGF ou le TGF $\beta$  jouer un rôle important dans la stabilisation des néo-vaisseaux.

## Conclusion

Notre connaissance de plus en plus complète des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse permet de définir de nouvelles cibles thérapeutiques qui sont actuellement exploitées pour développer les médicaments anti-angiogéniques de seconde génération.

## Références

1. Cohen S. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 33793-7.
2. Folkman J, *et al. Science* 1987 ; 235 : 442-7.
3. Leung DW, *et al. Science* 1989 ; 246 : 1306-9.
4. Plouet J, *et al. Embo J* 1989 ; 8 : 3801-6.
5. Carmeliet P, *et al. Nat Rev Clin Oncol* 2009 ; 6 : 315-26.
6. Ferrara N, *et al. Nat Med* 2003 ; 9 : 669-76.
7. Bais C, *et al. Cell* 2010 ; 141 : 166-77.
8. Van de Veire S, *et al. Cell* 2010 ; 141 : 178-90.
9. Tammela T, *et al. Cell* 2009 ; 140 : 460-76.
10. Davis S, *et al. Cell* 1996 ; 87 : 1161-9.
11. Maisonpierre PC, *et al. Science* 1997 ; 277 : 55-60.
12. Hato T, *et al. Trends Cardiovasc Med* 2008 ; 18 : 6-14.
13. Fiedler U, *et al. Trends Immunol* 2006 ; 27 : 552-8.
14. Shim WS, *et al. Mol Cancer Res* 2007 ; 5 : 655-65.
15. Seegar TC, *et al. Mol Cell* 2010 ; 37 : 643-55.
16. Andrae J, *et al. Genes Dev* 2008 ; 22 : 1276-12.
17. Betsholtz C. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004 ; 15 : 215-28.
18. Shi Y, *et al. Cell* 2003 ; 113 : 685-700.
19. Massague J, *et al. Genes Dev* 2005 ; 19 : 2783-810.
20. Sato Y, *et al. J Cell Biol* 1990 ; 111 : 757-63.
21. Hirschi KK, *et al. J Cell Biol* 1998 ; 141 : 805-14.
22. David L, *et al. Blood* 2007 ; 109 : 1953-61.
23. David L, *et al. Circ Res* 2008 ; 102 : 914-22.