



**HAL**  
open science

# L'angiogenèse tumorale : thérapie anti-angiogénique et risque thrombotique, problème d'actualité

Béatrice Faivre

► **To cite this version:**

Béatrice Faivre. L'angiogenèse tumorale : thérapie anti-angiogénique et risque thrombotique, problème d'actualité. Sciences pharmaceutiques. 2008. hal-01732236

**HAL Id: hal-01732236**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732236>**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1**

**2008**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**L'ANGIOGENESE TUMORALE**  
**THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE ET RISQUE**  
**THROMBOTIQUE, PROBLEME D'ACTUALITE.**

**THESE**

Présentée et soutenue publiquement

Le 23 octobre 2008

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Béatrice FAIVRE**  
née le 18 mars 1966 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

Président :	M. Claude VIGNERON,	Professeur, Hématologie, Faculté de Pharmacie, Nancy
Juges :	M. Pierre FEUGIER,	Professeur, Hématologie Clinique, Faculté de Médecine, Nancy
	M. Lionel GEOFFROIS,	Médecin oncologue, Centre Alexis Vautrin, Nancy
	M. Jean-Louis MERLIN,	Professeur, Biologie Cellulaire Oncologique, Faculté de Pharmacie, Nancy

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1  
FACULTE DE PHARMACIE

**DOYEN**

Chantal FINANCE

**Vice-Doyen**

Francine PAULUS

**Président du Conseil de la Pédagogie**

Pierre LABRUDE

**Responsable de la Commission de la Recherche**

Jean-Claude BLOCK

**Directeur des Etudes**

Gérald CATAU

**Responsable de la Commission des Relations Internationales**

Janine SCHWARTZBROD

**Responsable de la Communication**

Francine KEDZIEREWICZ

**Responsable de la Commission Hygiène Sécurité**

Laurent DIEZ

**Responsable de la filière Officine :**

Gérald CATAU

**Responsables de la filière Industrie :**

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

**Responsable du CEPH :**

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

**Doyen Honoraire :** Claude VIGNERON

**Professeur Emérite :** Gérard SIEST

**Professeurs Honoraires**

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

**Maîtres de Conférences Honoraires**

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

**Assistante Honoraire**

Madame BERTHE

## ENSEIGNANTS

### PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité) .....	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON .....	Pharmacologie
Gilles AULAGNER .....	Pharmacie clinique
Alain BAGREL .....	Biochimie
Jean-Claude BLOCK .....	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON .....	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE .....	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL .....	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU.....	Biochimie clinique
Christophe GANTZER .....	Microbiologie environnementale
Max HENRY .....	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU .....	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE .....	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie
Pierre LEROY.....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT.....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA.....	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS.....	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS.....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN.....	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD .....	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON.....	Hématologie, Physiologie

### MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT.....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS.....	Parasitologie
Mariette BEAUD.....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT.....	Communication et Santé
Michel BOISBRUN.....	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX.....	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX.....	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Gérald CATAU.....	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN.....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT.....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB.....	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Bernard DANGIEN.....	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN.....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU.....	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique

François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie, Génie biologique
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

#### **PROFESSEUR ASSOCIE**

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

#### **PROFESSEUR AGREGÉ**

Christophe COCHAUD..... Anglais

#### **ASSISTANT**

Annie PAVIS..... Bactériologie

#### **SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)**

Anne-Pascale PARRET..... Directeur  
Frédérique FERON..... Responsable de la section Pharmacie-  
Odontologie

# SERMENT DES APOTHICAIRES



**Je** jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

**D'** honorer ceux qui m'ont instruite dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que** les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que** je sois couverte d'opprobre et méprisée de mes confrères si j'y manque.

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI  
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS  
DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR »

## Remerciements

### **À Monsieur le Professeur Pierre FEUGIER**

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier en Hématologie clinique au CHU Brabois Adultes de Nancy

Pour avoir accepté de juger ce travail

Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

### **À Monsieur le Docteur Lionel GEOFFROIS**

Médecin oncologue au Centre anticancéreux régional Alexis Vautrin de Nancy

Pour avoir accepté de participer à ce jury

Qu'il trouve ici le témoignage de toute ma gratitude.

### **À Monsieur le Professeur Jean-Louis MERLIN**

Professeur des Universités en Biologie Cellulaire Oncologique à la Faculté de Pharmacie de Nancy et Responsable de l'unité de biologie des tumeurs au Centre Alexis Vautrin de Nancy

Pour ces récentes années à travailler ensemble dans la compétence et la bonne humeur.

Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance.

### **À Monsieur le Professeur Claude VIGNERON**

Professeur des Universités en Hématologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy et Praticien Hospitalier, Responsable du secteur exploration fonctionnelle du service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy

Pour ces longues années à travailler ensemble

Pour avoir accepté de diriger ce travail et de présider ce jury

Qu'il soit assuré de mon profond respect.

### **À Monsieur le Professeur Thomas LECOMPTE**

Professeur des Universités en Hématologie à la Faculté de Médecine de Nancy et Praticien Hospitalier, Chef du service d'Hématologie Biologique du CHU de Nancy

Pour son implication dans ma formation et dans ce travail de thèse. Avec mes vifs regrets de ne pouvoir le compter parmi les membres de ce jury.

Qu'il soit assuré de mon profond respect.

**À Baptiste et Benjamin**

Qui sont ma joie de vivre et qui m'ont soutenue à leur manière avec beaucoup de patience

**À mes parents**

Qui ont toujours été présents pour me soutenir et m'encourager

**À Audrey**

Qui est d'un soutien sans limite depuis de très nombreuses années

**À toute ma tribu**

Que j'aime retrouver et au sein de laquelle je me sens bien

**À ma filleule Marion**

**À mes filleuls Aloïs et Dane**

**À mes amis**

Valérie & Philippe et leurs loulous, Isabelle & Marcel et leurs filles, Pitchoune, Fred, Coco, Marie, Jean-Christophe, Olivier & Martine et leurs fils, Damien & Véro, Nadège, Martine...

**À mes collègues du labo**

Qui travaillent avec moi et me supportent depuis un bon nombre d'années

**À mes nouveaux collègues chercheurs**

Qui apportent un souffle nouveau sur mes activités

**À mes collègues enseignants**

Qui chaque jour m'ont donné le courage de poursuivre

**À toute l'équipe de la Pharmacie de l'Abbaye**

Qui m'a initiée au métier de l'officine avec compétence et bonne humeur

**À ma Pomme**

## LISTE DES ABREVIATIONS

12(S)-HETE	acide 12(S)-hydroxyeicosatétraénoïque.
ABP-280	actin binding protein 280 ou filamine
Ang-1	angiopoïétine-1
Ang-2	angiopoïétine-2
AP-1	activating protein 1
ATP	adénosine triphosphate
AVC	accident vasculaire cérébral
b-FGF	basic-fibroblast growth factor
CD	cluster de différenciation
CDK	cyclin dependent kinase
CEC	cellules endothéliales circulantes
CEP	progéniteurs de cellules endothéliales
Dll4	ligand delta-like 4
EGF	epithelial growth factor
EGFR	epithelial growth factor receptor
EPO	érythropoïétine
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ETEVE	Evénement thromboembolique veineux
ETEA	Evénement thromboembolique artériel
FAK	focal adhesion kinase
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	récepteur du FGF
Flk-1	fétal liver-kinase 1, gène codant pour VEGFR-2 chez la souris
Flt-1	fms-like tyrosine kinase-1 : gène codant pour VEGFR-1
FT	facteur tissulaire
FX	facteur X.
GH	growth hormone
GIST	gastro-intestinal stromal tumor.
HIF	hypoxia-induced factor
HPM FGF	FGF de haut poids moléculaire
HRE	hypoxia responsive element
HTA	hypertension artérielle
ICAM 1	inter-cellular adhesion molecule 1
IDM	infarctus du myocarde
IGF	insulin -like growth factor
IL	interleukine
ILGFR-1	type 1 insulin-like growth factor receptor
INF- $\gamma$	interféron- $\gamma$
IP3	inositol triphosphate
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KDR	kinase domain containing receptor, gène codant pour VEGFR-2 chez l'humain.

LPA	acide lysophosphatidique
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocytes chemotactic protein 1
MEC	matrice extracellulaire
MMP	matrix metalloproteinase
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
mTor	mammalian target of rapamycin
MVD	densité en microvaisseaux
NF $\kappa$ B	nuclear factor kappa B
NO	nitric oxide : monoxyde d'azote
NRP-1 ou -2	neuropiline-1 ou -2
ORP150	oxygen-regulated protein 150
PA	plasminogen activator
PAI	plasminogen activator inhibitor
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PEX	fragment d'hémopexine
PF-4	facteur plaquettaire 4
PHD	prolyl-hydroxylase domain-containing enzyme.
PI3K	phosphatidyl inositol-3 kinase
PIP2	phosphatidyl inositol-diphosphate,
PIP3	phosphatidyl inositol-triphosphate,
PKA	protéine kinase A
PKB	proteine kinase B = AKT
PKC	proteine kinase C
PLC	phospholipase C
PIGF	placenta growth factor
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10.
RECK	REversion-Inducing Cystein rich protein with Kazal motifs
SDF-1	stromal- cell derived factor-1.
STAT	signal transducer and activator of transcription
SuPAR	soluble urokinase plasminogen activator receptor
TGF- $\beta$	tumor growth factor- $\beta$
Tie-2	tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF-like domaine = TEK
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$
tPA	tissue plasminogen activator
TSP-1	thrombospondine-1
Tyr	tyrosine
uPA	urokinase plasminogen activator
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VDA	vascular disrupting agent
VE-cadherine	vascular endothelial cadherine
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von Hippel-Lindau

## TABLE DES MATIERES

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>A - Angiogenèse physiologique</b> .....	<b>2</b>
<b>A.1 Principe</b> .....	<b>3</b>
<b>A.2 Capillaire sanguin mature : état de quiescence endothéliale</b> .....	<b>7</b>
A.2.1 Signalisation Angiopoïétine/Tie-2 et phénotype de quiescence.....	8
A.2.1.1 Phénotype de quiescence : contact cellule-cellule et signalisation Ang-1/Tie-2.....	9
A.2.1.2 Phénotype angiogénique : absence de contact cellule-cellule et signalisation Ang-1/Tie-2.....	10
A.2.1.3 Régulation des fonctions de la cellule endothéliale quiescente.....	10
A.2.2 Membrane basale vasculaire et phénotype de quiescence.....	11
<b>A.3 Processus de l'angiogenèse</b> .....	<b>13</b>
A.3.1 Objectifs.....	13
A.3.2 Différents acteurs.....	13
A.3.3 Induction de l'angiogenèse.....	14
A.3.3.1 Induction par altération de la membrane basale vasculaire.....	14
A.3.3.2 Induction par surproduction de l'angiopoïétine 2.....	15
A.3.3.3 Induction par l'hypoxie.....	16
♦ Surexpression de molécules pro-angiogéniques par action directe d'HIF-1.....	16
♦ Surexpression de molécules pro-angiogéniques par action indirecte d'HIF-1.....	18
♦ Surexpression de molécules pro-angiogéniques indépendamment d'HIF-1.....	19
A.3.3.4 Induction par une réaction inflammatoire.....	20
A.3.4 Switch angiogénique.....	20
A.3.4.1 Principaux agents pro-angiogéniques et leurs récepteurs.....	21
♦ Signalisation par b-FGF.....	23
♦ Signalisation VEGFs / VEGFRs.....	25
♦ Signalisation Angiopoïétines / Tie-2.....	28
♦ Signalisation PDGF-BB / PDGFR.....	29
A.3.4.2 Principaux agents anti-angiogéniques.....	30
♦ Angiostatine.....	31
♦ Endostatine.....	32
♦ Tumstatine.....	32
♦ Facteur plaquettaire-4.....	32
♦ Thrombospondine-1.....	33
A.3.4.3 Stockage et disponibilité des différents agents pro-et anti-angiogéniques.....	35
♦ Rôle des protéoglycanes aux sulfates d'héparane (HSPG).....	35
♦ Rôle de la protéolyse matricielle.....	38
♦ Rôle des macrophages.....	43
A.3.5 Réponse de la cellule endothéliale aux agents pro-angiogéniques.....	44
A.3.5.1 Levée de l'état de quiescence.....	44
A.3.5.2 Gradient de VEGF-A et Sélection des « tip cell » et des « stalk cell ».....	45
♦ Gradient de VEGF-A.....	45
♦ Sélection des « tip cell » et apparition des « stalk cell ».....	46
♦ Expression protéique des cellules endothéliales angiogéniques.....	47
♦ Intégrines $\alpha\beta 3$ et $\alpha\beta 5$ et fonctions endothéliales.....	48
♦ Expression des systèmes uPA/uPAR/PAI-1 et MMPs.....	50
A.3.6 Maturation des néocapillaires.....	51
♦ Maturation par zone.....	51
♦ Hiérarchisation et sens du flux sanguin.....	53
<b>B - Angiogenèse tumorale</b> .....	<b>55</b>
<b>B.1 Différents acteurs angiogéniques dans les tumeurs solides</b> .....	<b>56</b>
<b>B.1 Différents acteurs angiogéniques dans les hémopathies malignes</b> .....	<b>58</b>
<b>B.2 Induction de l'angiogenèse tumorale</b> .....	<b>59</b>
B.2.1 Induction de l'angiogenèse tumorale par l'hypoxie.....	59
B.2.2 Induction de l'angiogenèse par des modifications génétiques.....	60
B.2.2.1 Tumeurs solides.....	60

B.2.2.2	Hémopathies malignes .....	61
<b>B.3</b>	<b>Switch angiogénique tumoral et signalisation VEGF/VEGFR .....</b>	<b>61</b>
B.3.1	Tumeurs solides .....	61
B.3.2	Hémopathies malignes .....	63
<b>B.4</b>	<b>Cancer-associated Fibroblastes (CAFs) .....</b>	<b>66</b>
<b>B.5</b>	<b>Rôle pro-angiogénique des protéases dans les tumeurs .....</b>	<b>67</b>
<b>B.6</b>	<b>Sévérité croissante du switch angiogénique .....</b>	<b>68</b>
<b>B.7</b>	<b>Phénotype tumoral des cellules endothéliales : phénotype aberrant .....</b>	<b>69</b>
B.7.1	Sélection des « tip-cell » et « stalk cell » .....	69
B.7.2	Phénotype procoagulant des cellules endothéliales tumorales .....	71
<b>B.8</b>	<b>Hémostase et angiogenèse tumorale.....</b>	<b>72</b>
B.8.1	Facteur tissulaire et angiogenèse tumorale .....	72
B.8.1.1	Cas des tumeurs solides.....	74
♦	Activité pro-angiogénique du FT indépendante de la cascade de la coagulation .....	74
♦	Activité pro-angiogénique du complexe FT/VII dépendant de la cascade de la coagulation .....	75
B.8.1.2	Cas des hémopathies malignes.....	77
B.8.2	Plaquettes et angiogenèse tumorale.....	78
B.8.2.1	Rôles pro-angiogéniques des plaquettes activées .....	78
B.8.2.2	Rôle prométastatique des plaquettes activées .....	80
<b>B.9</b>	<b>Cellules souches hématopoïétiques, précurseurs endothéliaux et angiogenèse tumorale.....</b>	<b>81</b>
<b>B.10</b>	<b>Structure et fonction des vaisseaux tumoraux.....</b>	<b>82</b>
<b>C -</b>	<b>Thérapies anti-angiogéniques en étude clinique .....</b>	<b>85</b>
<b>D -</b>	<b>Thérapies anti-angiogéniques et risque thrombotique.....</b>	<b>89</b>
<b>D.1</b>	<b>Thromboses et Cancer.....</b>	<b>90</b>
D.1.1	Facteurs de risque.....	90
D.1.2	Physiopathologie.....	91
D.1.3	Incidence .....	91
D.1.4	Thérapeutiques anticancéreuses.....	92
<b>D.2</b>	<b>Molécules anti-angiogéniques et événements thrombo-emboliques.....</b>	<b>92</b>
D.2.1	Inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR .....	92
D.2.1.1	Antagonistes directs du VEGF.....	92
♦	Bevacizumab (AVASTIN®) .....	93
♦	VEGF-Trap.....	95
D.2.1.2	Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (TKIs) .....	95
♦	Sorafenib .....	95
♦	Sunitinib .....	95
♦	Autres TKIs .....	96
D.2.1.3	Mécanismes thrombotiques induits par l'inhibition de la signalisation VEGF/VEGFR.....	96
D.2.2	Analogues des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse .....	98
D.2.2.1	Endostatine recombinante humaine et mécanismes thrombotiques.....	98
D.2.2.2	Angiostatine recombinante humaine et mécanismes thrombotiques .....	99
D.2.3	Immunomodulateurs à activité anti-angiogénique .....	100
D.2.3.1	Thalidomide .....	100
D.2.3.2	IMiDs: Lenalidomide et Actimid.....	102
♦	Lenalidomide.....	102
♦	Actimid (CC-4047).....	102
D.2.3.3	Mécanismes thrombotiques de la thalidomide et des IMiDs .....	102
D.2.4	Autres antiangiogéniques.....	104
D.2.5	VDA (vascular disrupting agents) .....	105
<b>Conclusion</b> .....	<b>106</b>	
<b>Références Bibliographiques</b> .....	<b>108</b>	

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

Figure 1 : Mécanistique moléculaire simplifiée de la vasculogénèse .....	3
Figure 2 : Mise en place de l'angiogénèse et de la lymphangiogénèse à partir d'un réseau capillaire primitif ou d'un réseau vasculaire mature. ....	4
Figure 3 : Mécanistique moléculaire simplifiée de la vasculogénèse, de l'angiogénèse par bourgeonnement et de la régression vasculaire.....	5
Figure 4 : Processus de vasculogénèse et d'angiogénèse par intussusception ou sprouting.....	6
Figure 5 : Structure d'un capillaire mature. ....	7
Figure 6 : Signalisation Angiopoïétines / Tie2 et ses conséquences sur la fonction endothéliale.....	8
Figure 7 : Phénotype de quiescence ou d'angiogénèse induit par la signalisation Ang-1-Tie-2. ....	9
Figure 8 : Contrôle de l'expression de HIF par la pression tissulaire en oxygène.....	17
Figure 9 : Balance des facteurs pro et anti-angiogéniques en faveur d'un signal pro-angiogénique.....	20
Figure 10 : Pathologies dérivant d'un switch angiogénique.....	21
Figure 11 : Libération de b-FGF par une cellule périvasculaire (cellule musculaire lisse) dans la matrice extracellulaire par action de la thrombine et du PDGF-BB. ....	23
Figure 12 : Types de molécules fixant b-FGF (ou FGF-2).....	24
Figure 13 : Agonistes ou antagonistes potentiels sur les différents récepteurs cibles endothéliaux de b-FGF.....	24
Figure 14 : Représentation schématique des événements pro-angiogéniques attribués au b-FGF. ....	25
Figure 15 : Signalisation VEGF/VEGFR et ses cofacteurs .....	27
Figure 16 : Structure de la thrombospondine-1 (TSP-1).....	33
Figure 17 : Récapitulatifs des différents modes d'action de la thrombospondine-1. ....	34
Figure 18 : Conséquences biologiques sur l'endothélium de l'interaction b-FGF/HSPG. ....	37
Figure 19 : Structure des MMPs.....	40
Figure 20 : Cascade d'activation des MMPs. ....	41
Figure 21 : Systèmes plasminogène/ uPA/uPAR et MMPs impliqués dans la protéolyse matricielle..	42
Figure 22 : Cycle angiogénique du développement vasculaire.....	45
Figure 23 : Bourgeonnement vasculaire. ....	45
Figure 24 : Sélection des « tip cell » et prolifération des « stalk-cell » en réponse à un gradient de VEGF-A. ....	46
Figure 25 : Signalisation VEGF-A/VEGFR-2 et Dll4/Notch dans la régulation des phénotypes « tip cell » et « stalk cell » .....	47
Figure 26 : Intégrines exprimées par la cellule endothéliale angiogénique et leurs ligands matriciels. ....	48
Figure 27. Intégrines exprimées par une cellule endothéliale angiogénique et ligands divers .....	49
Figure 28 : Implication des intégrines dans la plupart des voies de signalisation. ....	49
Figure 29 : Expression moléculaire de la cellule endothéliale en réponse au VEGF et conséquences sur son micro-environnement.....	50
Figure 30 : Etape de la croissance vasculaire par angiogénèse : cas de la rétine.....	51
Figure 31 : Différenciation artério-veineuse des vaisseaux par la signalisation Ephrin-B2/EphB4. ....	52
Figure 32 : Hiérarchisation du réseau vasculaire et sens du flux au cours de l'angiogénèse. ....	53
Figure 33 : Mécanismes et acteurs de l'angiogénèse dans les tumeurs solides.....	57
Figure 34 : Mécanismes et acteurs de l'angiogénèse dans les hémopathies malignes .....	58
Figure 35 : Surexpression de HIF-1 $\alpha$ dans différentes conditions pathologiques dont le cancer. ....	59
Figure 36 : Activités biologiques résultant de la signalisation VEGF/VEGFR. ....	63
Figure 37 Régulation de l'expression du VEGF dans les hémopathies malignes en général. ....	64
Figure 38 : Fonctions physiopathologiques du VEGF dans le microenvironnement médullaire.....	65
Figure 39 : Fonctions du fibroblaste activé (CAF) dans le stroma tumoral d'une tumeur solide.....	66
Figure 40 : Rôles des deux systèmes protéasiques MMPs et uPA/uPAR/PAI-1 impliqués dans la tumorigénèse. ....	68
Figure 41 : Diversité croissante des facteurs pro-angiogéniques et accumulation au cours du développement d'une tumeur solide. ....	68

Figure 42 : Bourgeonnement capillaire selon le gradient en VEGF-A et la signalisation Dll4/Notch. ..	70
Figure 43 : Structures capillaires tumorales <i>in vitro</i> avec inhibition ou non de la signalisation Dll4/Notch.....	70
Figure 44 : Phénotype procoagulant de la cellule endothéliale tumorale.....	71
Figure 45 : Evénements induisant la surexpression du facteur tissulaire et conséquences pour la tumeur .....	73
Figure 46 : Voies d'activation de l'angiogenèse tumorale par le facteur tissulaire dans les hémopathies malignes et dans les tumeurs solides .....	73
Figure 47 : Activité pro-angiogénique du Facteur tissulaire indépendamment de la cascade de coagulation dans le cas de tumeurs solides.....	74
Figure 48 : Activité pro-angiogénique du FT via le facteur Xa ou la thrombine dans les tumeurs solides.....	76
Figure 49 : Activité pro-angiogénique du thrombus dans le cas de tumeurs solides.....	76
Figure 50 : Signalisations pro-angiogéniques induites par le facteur tissulaire dans le développement des hémopathies malignes.....	77
Figure 51 : Interaction de la plaquette avec la cellule endothéliale par le couple CD154/CD40 dans l'hémostase, l'angiogenèse et l'inflammation .....	79
Figure 52 : Interactions entre les cellules tumorales et les plaquettes et conséquences biologiques.....	80
Figure 53 : Co-mobilisation des cellules hématopoïétiques et des précurseurs endothéliaux circulants.....	82
Figure 54 : Architecture vasculaire tumorale et perfusion.....	83
Figure 55 : Altération de la régulation des états thrombotique et hémorragique par les cellules tumorales.....	90
Figure 56 : Principales cibles anti-angiogéniques et mécanismes d'actions.....	93
Figure 57 : Mécanisme d'action du sunitinib.....	96
Figure 58 : Effets prothrombotiques des molécules thérapeutiques anti-angiogéniques.....	98
Figure 59 : Mécanismes d'actions de la Thalidomide et ses analogues dans le myélome multiple. ....	101
Figure 60 : Mécanismes moléculaires expliquant l'état pro-thrombotique des patients traités par la thalidomide.....	103

## TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des molécules pro-angiogéniques exprimées en réponse à l'hypoxie.....	18
Tableau 2 : Régulation des gènes cibles de HIF-1 par d'autres facteurs de transcription .....	19
Tableau 3 : Liste des principaux facteurs endogènes pro-angiogéniques et mécanismes d'actions .....	22
Tableau 4 : Principaux agents anti-angiogéniques et leur provenance.....	30
Tableau 5 : Fragments protéiques cryptiques anti-angiogéniques de la matrice extracellulaire.....	30
Tableau 6 : Effets biologiques majeurs des principaux anti-angiogéniques endogènes .....	31
Tableau 7 : Liste des facteurs de croissance, cytokines et chimiokines fixant l'héparine et acteurs dans l'angiogenèse.....	36
Tableau 8 : Principales métalloprotéases matricielles humaine ( MMPs) et leur substrat.....	40
Tableau 9 : Protéines connues pour être surexprimées par des cellules endothéliales cultivées en présence de VEGF.....	47
Tableau 10 : Voies moléculaires impliquées dans la maturation des vaisseaux.....	54
Tableau 11 : Impact de différents oncogènes sur l'angiogenèse tumorale dans les tumeurs solides. ....	60
Tableau 12 : Impact de l'activité de l'oncogène <i>ras</i> sur l'expression d'agents pro et anti-angiogéniques.....	60
Tableau 13 : Corrélation entre la concentration trouvée en b-FGF (FGF-2) ou VEGF et la densité vasculaire maligne (MDV) ou l'état clinique du patient dans différentes pathologies cancéreuses.....	62
Tableau 14 : Rôle des différentes molécules stockées et libérées par les plaquettes .....	78
Tableau 15 : Principales molécules anti-angiogéniques en essais cliniques en 2007, principaux modes d'action et événements vasculaires indésirables rapportés.....	87

## INTRODUCTION

La thérapie anti-angiogénique est en pleine émergence dans le traitement des cancers. Si les résultats sont prometteurs, cette thérapie n'est pas sans risque. Ce travail a pour objectif de montrer le terrain vasculaire sur lequel agit la thérapie anti-angiogénique dans le cas de pathologies cancéreuses et de comprendre les risques thrombotiques encourus.

Processus particulièrement complexe et important dans le développement de l'organisme (embryogenèse, croissance), l'angiogenèse n'intervient pratiquement plus dans les tissus adultes sains.

Excepté lors de la réparation tissulaire où son action est bénéfique, elle joue un rôle néfaste dans le développement des tumeurs (hémangiome, cancer), dans l'accompagnement de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde ou encore dans la rétinopathie diabétique.

Comprendre l'implication de l'angiogenèse dans le développement tumoral cancéreux et les événements métastatiques nécessite d'exposer dans ce travail le principe et la mécanistique de l'angiogenèse physiologique dans un premier chapitre pour ensuite développer, dans un second, les différences mécanistiques de l'angiogenèse tumorale.

Dans le traitement du cancer, la thérapie anti-angiogénique est un pari stratégique auquel nous consacrerons un chapitre pour présenter les principales molécules en développement clinique.

Cependant, la pathologie cancéreuse est un contexte clinique particulier eu égard aux risques de survenues d'événements thromboemboliques et l'utilisation de la thérapie anti-angiogénique peut aggraver ce risque. Pour comprendre cela, dans un dernier chapitre, nous décrirons ce contexte clinique particulier et nous présenterons pour les molécules anti-angiogéniques ayant donné lieu à des événements thromboemboliques, les mécanismes moléculaires mis en jeu et supposés responsables de ces événements.

**A - ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE**

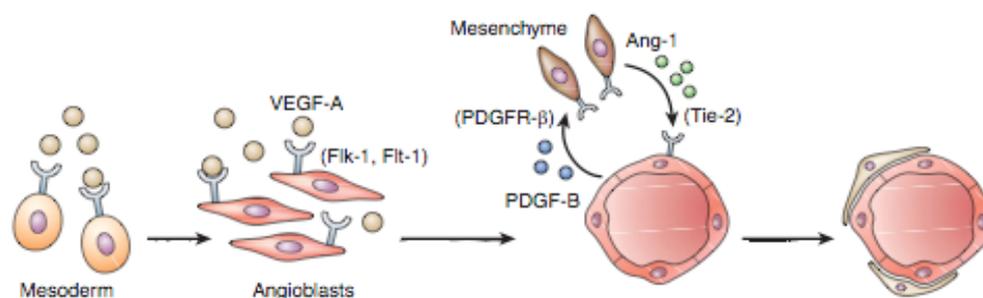
L'angiogenèse est un processus de néovascularisation prenant naissance à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle est très importante et indispensable au cours de nombreux processus physiologiques comme la reproduction (développement embryonnaire, implantation du placenta, cycles menstruels...) ou la cicatrisation mais également dans de nombreuses situations pathologiques comme la polyarthrite rhumatoïde, la rétinopathie diabétique, le psoriasis, l'hémangiome, et le cancer.

## A.1 Principe

L'angiogenèse consiste à générer de nouveaux capillaires sanguins à partir d'un réseau capillaire préexistant.

Ce processus est à différencier du processus de vasculogenèse qui consiste à créer un réseau capillaire primitif à partir de progéniteurs mésenchymateux pluripotents (précurseurs hémangioblastiques) regroupés en îlots de Wolf et Pander chez l'embryon ou encore à partir de précurseurs endothéliaux circulant dans les tissus ischémiés.

Depuis quelques années, la recherche sur l'angiogenèse et la vasculogenèse ne se limite plus à une description de celle-ci et de nombreux acteurs moléculaires ont été identifiés et permettent à présent de connaître quelques lignes de la mécanistique moléculaire de la vasculogenèse. Cette mécanistique est importante car elle sera retrouvée également dans l'angiogenèse (figure 1)

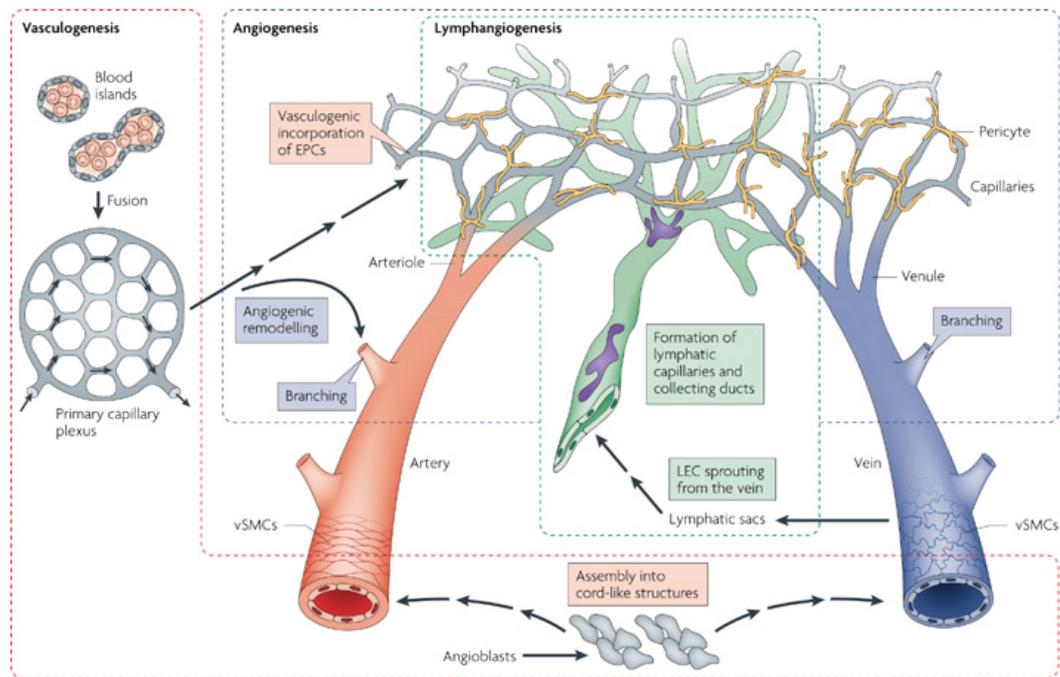


**Figure 1 : Mécanistique moléculaire simplifiée de la vasculogenèse**  
(adapté de Cleaver et al, 2003)

Sous l'action du VEGF (vascular endothelial growth factor), les angioblastes (cellules mésenchymateuses) exprimant constitutivement les récepteurs au VEGF (VEGFR1 (Flt-1) et VEGFR-2 (Flk-1)) prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales (via VEGFR-2) qui

s'assemblent ensuite en structures capillaires (via VEGFR-1). Ces cellules endothéliales secrètent alors le PDGF-BB (isoforme BB du Platelet Derived Growth Factor) qui permet la différenciation de cellules mésenchymateuses exprimant le PDGFR- $\beta$  (Récepteur  $\beta$  du PDGF-BB) en péricytes qui vont d'une part sécréter l'angiopoïétine 1 et d'autres part être recrutés par le capillaire. L'angiopoïétine 1 agit sur les récepteurs Tie-2 exprimés par les cellules endothéliales et permet à celles-ci de rester en contact les unes avec les autres. Le recrutement des péricytes intervient pour stabiliser la structure capillaire formée.

Ce réseau capillaire primitif s'adapte ensuite, se remodèle et croît par angiogenèse (figure 2).

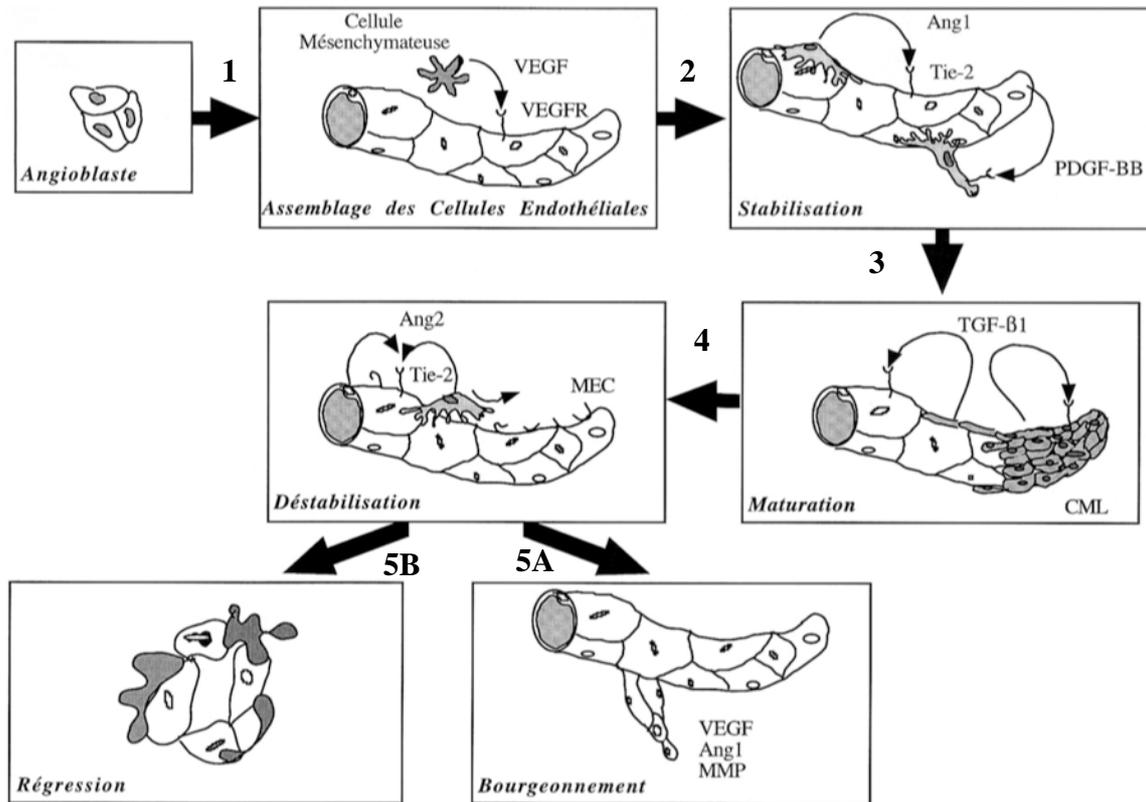


**Figure 2 : Mise en place de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse à partir d'un réseau capillaire primitif ou d'un réseau vasculaire mature.**  
(tiré de Adams et al, 2007)

Pour les vaisseaux de calibres supérieurs au capillaire, une étape de maturation est nécessaire permettant de renforcer la structure du vaisseau : les cellules musculaires lisses vont être recrutées sur les cellules endothéliales ou sur les cellules péri-vasculaires déjà en place (péricytes et cellules musculaires) par action du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) libérés par les cellules endothéliales stabilisées (figure 3 étape 3). Ces vaisseaux matures sont délimités par des cellules endothéliales présentant un phénotype de quiescence : elles ne se divisent pas, elles ne migrent pas, elles sont stabilisées par rapport à cela.

Chez l'adulte, le processus de l'angiogenèse a pour point de départ des capillaires matures, stabilisés et quiescents

La cible véritable de ce processus est la cellule endothéliale délimitant ces capillaires et présentant un phénotype de quiescence :



**Figure 3 : Mécanisme moléculaire simplifié de la vasculogenèse, de l'angiogenèse par bourgeonnement et de la régression vasculaire**

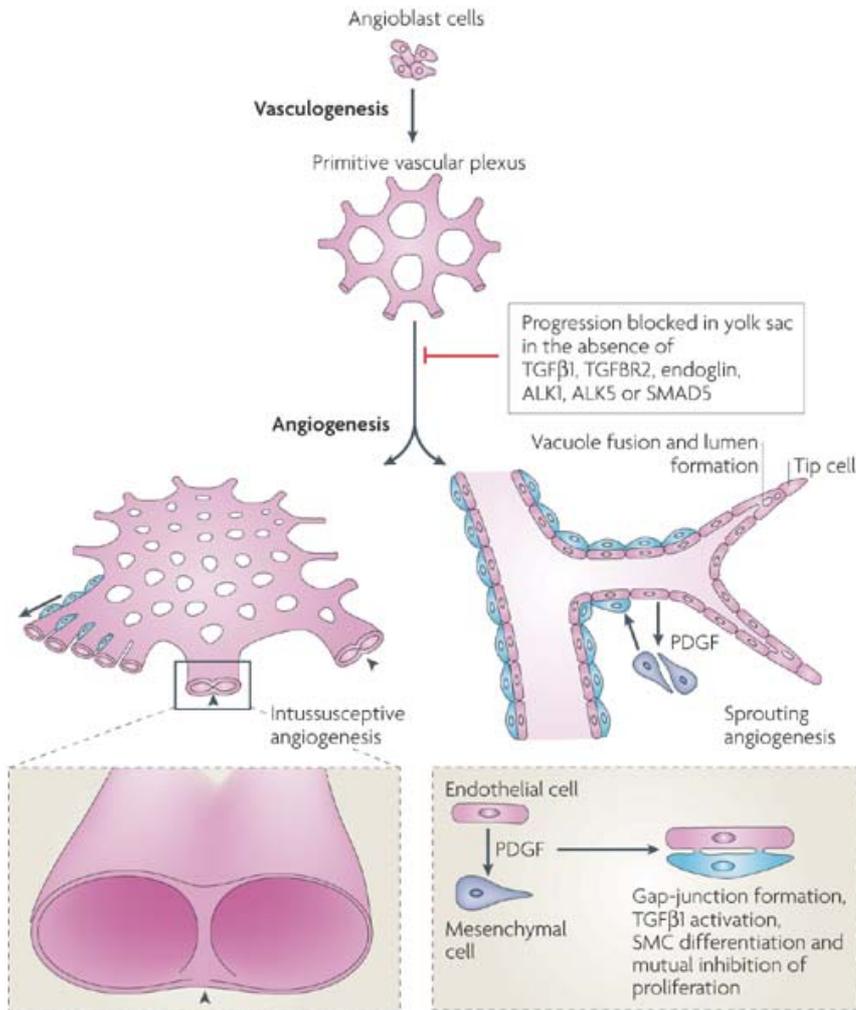
Vasculogenèse (étape 1 et 2), Maturation (étape 3), Angiogenèse par bourgeonnement (étapes 4 et 5A) Régression vasculaire (étapes 4 et 5B) (adapté de Couffinhal et al, 2001)

Le processus de l'angiogenèse correspond par conséquent aux différents mécanismes moléculaires imposant à la cellule endothéliale de passer d'un phénotype de quiescence à un phénotype angiogénique qui lui permettra de sortir de son état de quiescence (destabilisation, étape 4 figure 3) de proliférer, de migrer, de se différencier, de former de nouvelles structures capillaires (étape 5A figure 3) et enfin de les stabiliser en retournant à leur phénotype de quiescence (étapes 2 et 3 figure 3).

L'angiogenèse se développe selon deux mécanismes fondamentaux : le « sprouting » (ou bourgeonnement) et l'intussusception (figure 4).

Au cours du « sprouting », quelques cellules endothéliales sont déstabilisées (ou activées), ce qui conduit, par libération de métalloprotéase matricielle (MMP), à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Ces cellules peuvent alors entamer une migration orientée vers la matrice extracellulaire suivie d'une phase de prolifération puis d'une différenciation en structures capillaires (étape 5A figure 3 et figure 4).

L'angiogénèse intussusceptive est caractérisée, quant à elle, par la création de nouveaux vaisseaux suite à un élargissement de vaisseaux préformés associé à une septation par migration de cellules endothéliales en direction de la lumière du vaisseau (figure 4).



**Figure 4 : Processus de vasculogénèse et d'angiogénèse par intussusception ou sprouting.**

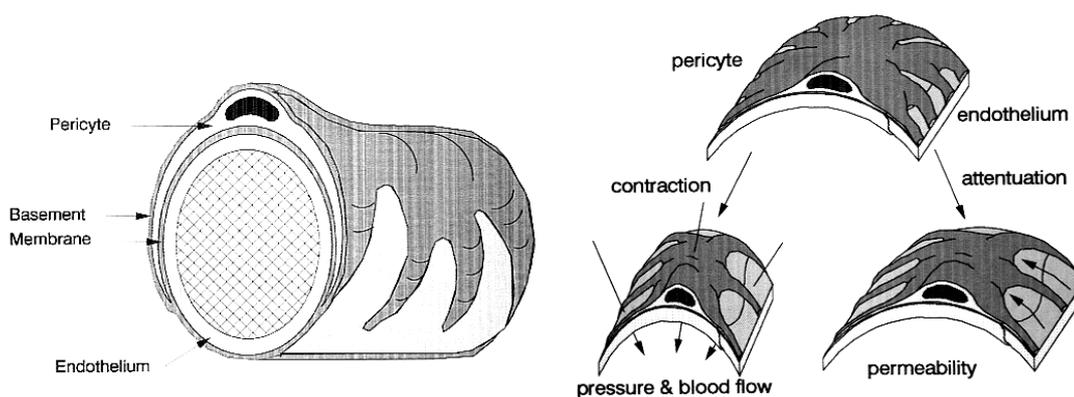
PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes. SMC : cellule musculaire lisse. Tip cell : cellule de tête. (tiré de ten Dijke et al, 2007)

Pour comprendre le processus angiogénique tumoral ainsi que le mode d'action des thérapeutiques anti-angiogéniques et leurs effets indésirables, il est nécessaire d'approfondir les connaissances du terrain vasculaire sur lequel un processus angiogénique physiologique ou tumoral va pouvoir prendre naissance.

Ce terrain est constitué de capillaires sanguins (ou lymphatiques mais nous ne les traiterons pas ici) matures stabilisés par une fine régulation moléculaire ciblant essentiellement la cellule endothéliale quiescente.

## **A.2 Capillaire sanguin mature : état de quiescence endothéliale**

Chez l'adulte, les vaisseaux sont quiescents et le temps de turnover des cellules endothéliales de plusieurs centaines de jours. Cette quiescence assure une stabilité structurale et fonctionnelle au vaisseau.



**Figure 5 : Structure d'un capillaire mature.**

(tiré de [http:// 1](http://1))

Un capillaire sanguin stable, quiescent est constitué d'une seule assise continue de cellules endothéliales qui constitue une barrière à perméabilité réduite et modulable entre le sang et les tissus environnants. Cette assise repose sur une membrane basale synthétisée et entretenue par les cellules endothéliales. Cette structure est recouverte de manière discontinue par des péricytes dont la fonction est de réguler, par leur contraction, la pression et le débit sanguin au sein des capillaires, de diminuer en se rétractant la perméabilité vasculaire et de renforcer le contact entre les cellules, renforçant ainsi la stabilité du capillaire (figure 5).

Pour que ce capillaire reste stable, que l'assise endothéliale reste continue et unique, la cellule endothéliale doit être dans un phénotype de quiescence.

L'état de quiescence des cellules endothéliales est assuré principalement par deux acteurs anti-angiogéniques :

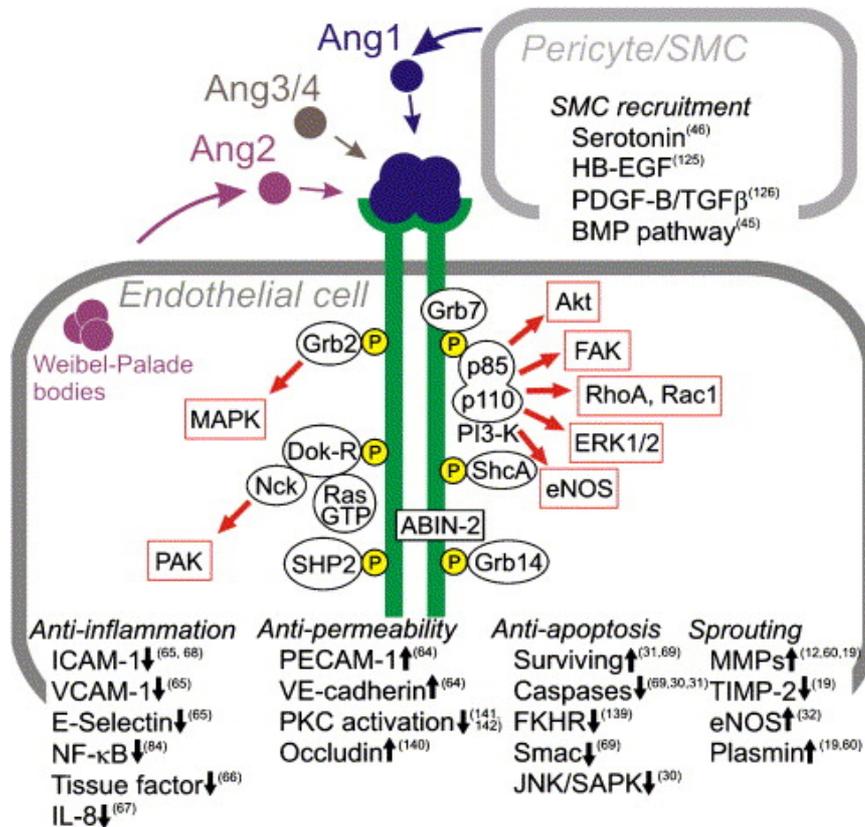
- la signalisation Angiotensine-1/ Tie-2 récepteur qui intervient dans l'interaction cellule-cellule et cellule-matrice, et induit une signalisation intracellulaire anti-angiogénique
- la membrane basale dont certains domaines sont anti-angiogéniques.

Ces deux acteurs induisent et maintiennent le phénotype de quiescence endothéliale.

### A.2.1 Signalisation Angiopoïétine/Tie-2 et phénotype de quiescence

Le récepteur Tie-2 (ou TEK, transmembrane endothelial kinase) est principalement et constitutivement exprimé par les cellules endothéliales tant vasculaires que lymphatiques (28, 101). C'est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine-kinase. Il possède différents ligands qui appartiennent à la famille des angiopoïétines. Les plus importants sont l'angiopoïétine-1 (Ang-1) produit par les cellules périvasculaires (péricytes et cellules musculaires lisses) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2) produit par la cellule endothéliale (10, 28, 101)

La mécanistique moléculaire située en aval du récepteur Tie-2 n'est pas encore réellement comprise mais il est admis que la majorité des voies de signalisations intracellulaires actuellement connues soient impliquées (AKT, FAK, ERK, eNOS, MAPK...) (28). Il en résulte un ensemble de réponses endothéliales impliquées dans la perméabilité capillaire, dans l'apoptose endothéliale, dans l'inflammation périvasculaire et dans l'angiogenèse par bourgeonnement (figure 6).



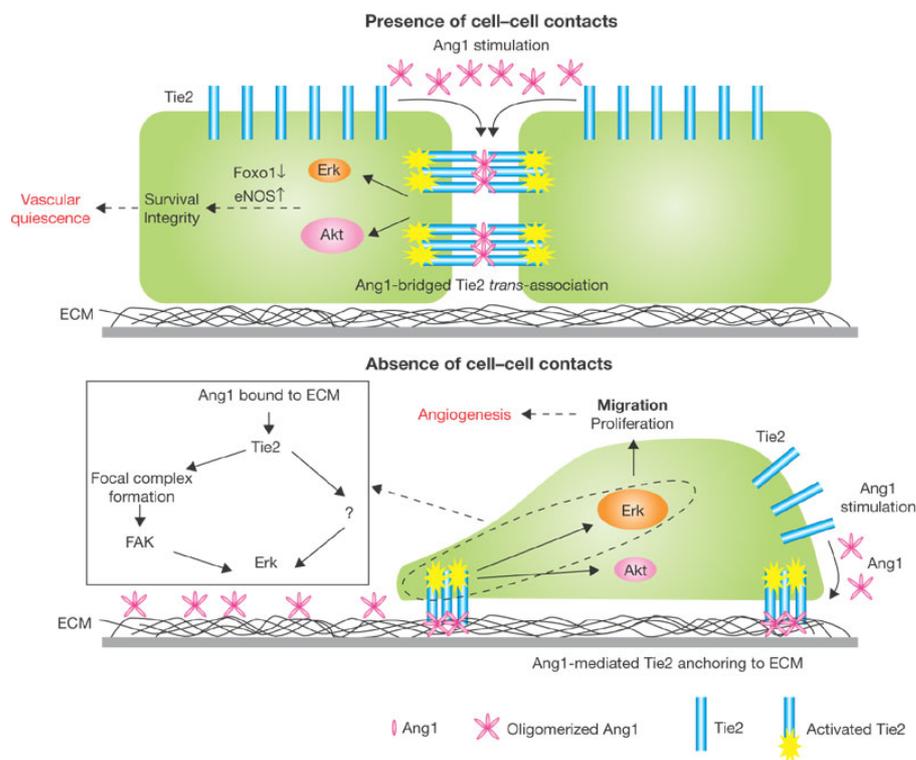
**Figure 6 : Signalisation Angiopoïétines / Tie2 et ses conséquences sur la fonction endothéliale.**  
(tiré de Eklund et al, 2006)

Dans le cas de l'angiogenèse par bourgeonnement, ce récepteur fonctionne de manière très complexe. Nous l'avons vu sur la figure 3, ce récepteur lié à l'angiopoïétine-1 permet à la fois la stabilisation du capillaire (étape 2) et son bourgeonnement (étape 5A) après destabilisation par action de l'angiopoïétine-2 (étape 4).

Pour comprendre ce qui peut sembler être un paradoxe, nous allons souligner comment l'angiopoïétine-1 induit ou maintient la cellule endothéliale dans son phénotype de quiescence et comment elle induit le phénotype angiogénique (figure 7) (95).

#### A.2.1.1 Phénotype de quiescence : contact cellule-cellule et signalisation Ang-1/Tie-2

Lorsque les cellules endothéliales sont en contact les unes avec les autres, l'angiopoïétine-1, libérée par les péricytes, se polymérise et induit la migration des récepteurs transmembranaires Tie-2 en direction des surfaces latérales des cellules. Par interaction avec deux récepteurs Tie-2 de deux cellules adjacentes, elle établit un pont de signalisation entre elles. Le signal qui en résulte aboutit à l'entrée ou au maintien des cellules endothéliales dans un phénotype de quiescence avec augmentation de leur survie (baisse de l'activité des caspases) et surexpression de molécules d'ancrage comme les VE-cadhérines, PECAM (CD31) renforçant ainsi la stabilité du capillaire (11, 33)



**Figure 7 : Phénotype de quiescence ou d'angiogenèse induit par la signalisation Ang-1-Tie-2.**  
ECM : matrice extracellulaire. (tiré de Fukuhara et al, 2008 )

### **A.2.1.2 Phénotype angiogénique : absence de contact cellule-cellule et signalisation Ang-1/Tie-2**

En cas d'absence de cellule adjacente, la migration des récepteurs Tie-2 induite par l'angiopoïétine-1 se poursuit jusqu'à la partie basale de la cellule. L'angiopoïétine-1 se lie à la fois sur son récepteur Tie-2 et à la matrice extracellulaire (MEC). Elle établit alors un pont de signalisation entre la cellule endothéliale et la matrice environnante. Le signal qui en résulte est un signal d'angiogenèse avec prolifération endothéliale et migration (33).

Ainsi l'angiopoïétine-1 permet de polariser les cellules endothéliales. Cette polarisation participe à l'induction des différents phénotypes : expression latérale de cadhérines permettant le contact cellule-cellule dans le cas du phénotype de quiescence ou expression basale d'intégrines spécifiques ( $\alpha\beta3$  par exemple) permettant le contact cellule-matrice et la migration cellulaire dans le cas du phénotype angiogénique.

Si la signalisation Ang-1/Tie-2 est fortement responsable de l'état de quiescence de la cellule endothéliale, elle n'est pas sans subir une régulation afin de permettre à la cellule endothéliale quiescente d'assurer efficacement ses fonctions destinées à maintenir l'intégrité structurale du capillaire mais également l'homéostasie vasculaire.

### **A.2.1.3 Régulation des fonctions de la cellule endothéliale quiescente**

Dans la cellule endothéliale quiescente, le récepteur Tie-2 est constitutivement exprimé et phosphorylé par action de l'angiopoïétine-1 multimérique produite par les péricytes. Il est régulé de manière autocrine par la cellule endothéliale qui produit et stocke dans ses corps de Weibel-Palade l'angiopoïétine-2, principal antagoniste du récepteur Tie-2. Sa libération permet ainsi de moduler les effets de la signalisation Ang-1/Tie-2. Les conséquences sont : une perméabilité capillaire localement modulée avec diapédèse des leucocytes selon les besoins, un recrutement de cellules périvasculaires adapté au calibre du vaisseau, une libération des métalloprotéases matricielles endothéliales restreinte, un turnover des cellules endothéliales lent mais actif, un bourgeonnement capillaire inhibé, etc.

Ainsi à concentration faible, l'angiopoïétine-2 module la phosphorylation du récepteur Tie-2 induite par l'angiopoïétine-1 dans le phénotype de quiescence. Cela permet un fonctionnement adapté du vaisseau et son entretien.

En excès, l'angiopoïétine-2 déstabilise le capillaire et la cellule endothéliale qui, en présence de VEGF, acquiert un phénotype angiogénique, alors qu'en absence de VEGF, la régression du capillaire est observée.

Mais cet état quiescent de la cellule endothéliale n'est pas sous l'unique responsabilité de cette signalisation Ang-1/Tie-2 et du contact cellule - cellule. Elle dépend également de la membrane basale vasculaire.

### **A.2.2 Membrane basale vasculaire et phénotype de quiescence**

L'endothélium repose sur une membrane basale (MB) dans les capillaires quiescents et ce contact cellule - membrane basale induit un signal anti-angiogénique.

La composition de la membrane basale est typique de l'épithélium qu'elle supporte et qui la synthétise. Elle assure ainsi les fonctions particulières à celui-ci.

Les composants de la membrane basale vasculaire, indispensables au maintien de l'intégrité vasculaire, sont majoritairement le collagène IV (50%), la laminine, le perlecan (protéoglycane à héparane-sulfate) et le nidogen/entactin. Elle comprend aussi minoritairement d'autres composants comme les collagènes de type XV et XVIII.

Par les molécules pro-angiogéniques comme le b-FGF (basic Fibroblast growth factor) qu'elle fixe via le perlecan et via les domaines cryptiques anti-angiogéniques des collagènes IV, XV et XVIII qui la constituent, la membrane basale peut être, selon le contexte, pro ou anti-angiogénique (94, 112).

Spontanément, après leur synthèse endothéliale, les composants de la membrane basale s'assemblent en feuillets qui favorisent l'exposition aux cellules endothéliales des domaines cryptiques anti-angiogéniques. L'ancrage de ces cellules à la membrane basale via la laminine et des récepteurs endothéliaux protéiques de types intégrine  $\beta 1$  ou dystroglycanes assure l'interaction de la cellule endothéliale avec ces domaines anti-angiogéniques et le masquage des récepteurs endothéliaux pro-angiogéniques de types VEGFR (vascular endothelium growth factor receptor) et b-FGFR (basic- fibroblast growth factor receptor) (49).

Ainsi, dans le cas d'une membrane basale saine (non dégradée), le signal global résultant de cette interaction cellule endothéliale - membrane basale est un signal anti-angiogénique. Ce signal inhibe la prolifération des cellules endothéliales, permet un environnement favorable au contact entre cellules endothéliales et par conséquent le maintien de celles-ci dans leur phénotype de quiescence. Les cellules endothéliales participent à maintenir leur ancrage et leur interaction avec la membrane basale en ne libérant que très peu de métalloprotéases matricielles (MMps). La membrane basale garde, par conséquent, son intégrité et son activité anti-angiogénique sur l'endothélium.

Par comparaison, les cellules souches hématopoïétiques dont l'état de quiescence dépend également de la signalisation Ang-1/Tie-2 ne reposent pas sur une lame basale (28). Si on compare le turnover des cellules souches hématopoïétiques et des cellules endothéliales, il apparaît que la membrane basale joue un rôle très important dans le maintien des cellules endothéliales dans cet état quiescent. En effet le temps de turnover des cellules endothéliales est de plusieurs centaines de jours à la différence des cellules de la moelle osseuse qui, ne reposant pas sur une telle membrane basale, ont un temps de turnover moyen de 5 jours seulement (28)

Par ailleurs, la cellule endothéliale libère du PDGF-BB (isoforme BB du Platelet Derived Growth Factor) qui permet la différenciation de cellules mésenchymateuses périvasculaires en péricytes et leur recrutement nécessaire à stabiliser le contact cellule - cellule et cellule - membrane basale. Ces péricytes, quant à eux, produisent l'angiopoïétine-1 et participent ainsi à entretenir la quiescence endothéliale via la signalisation Ang-1/Tie-2.

Cette régulation du phénotype de quiescence via la signalisation angiopoïétines/Tie-2 et la membrane basale, renforcée par l'action des péricytes permet aux cellules endothéliales d'être les cellules les plus quiescentes de l'organisme. Ces cellules sont également les plus stables génétiquement.

En conclusion, la cellule endothéliale présente un phénotype de quiescence qui dépend

- de la signalisation Ang-1/Tie-2 modulée par de faible concentration en Ang-2 endothéliale et
- de l'intégrité de la membrane basale.

Ce phénotype de quiescence ainsi régulé permet à la cellule d'assurer de nombreuses fonctions mais ne lui permet ni de proliférer ni de migrer à la différence du phénotype angiogénique.

La cellule endothéliale présentant un phénotype de quiescence est la cible du processus de l'angiogenèse.

## **A.3 Processus de l'angiogenèse**

### **A.3.1 Objectifs**

Le processus de l'angiogenèse a pour objectif d'activer les cellules endothéliales quiescentes afin qu'elles acquièrent un phénotype angiogénique qui leur permette de proliférer et de migrer pour la mise en place de nouveaux capillaires fonctionnels.

Comme nous l'avons précisé, l'état quiescent du capillaire dépend d'une régulation très fine nécessitant le contact des cellules endothéliales entre elles et avec la lame basale, et la signalisation Angiopoïétines -1 et 2/Tie-2. La moindre modification de cet équilibre peut induire l'apparition d'un signal pro-angiogénique.

### **A.3.2 Différents acteurs**

Pour la mise en place d'une nouvelle vascularisation fonctionnelle, trois grands types d'acteurs sont indispensables : les **inducteurs** et auteurs du signal d'appel, la **matrice extracellulaire** : véritable réservoir de molécules à activités biologiques cryptiques, de cellules stromales et immunitaires et enfin le(s) **capillaire(s)** et leurs cellules endothéliales : véritable cible.

Ces trois types d'acteurs sont en interaction permanente via de très nombreuses molécules.

Ce contrôle moléculaire de l'angiogenèse est de mieux en mieux connu grâce aux progrès considérables concernant l'identification de gènes codant pour des facteurs de croissance, des récepteurs ou des facteurs de transcription impliqués dans ce processus et grâce à l'étude de leur mécanisme d'action. Mais il n'en reste pas moins très complexe.

En effet, ces molécules peuvent être solubles, cryptiques ou encore membranaires. Elles peuvent servir de ligands, de récepteurs ou encore d'enzymes. Leur rôle peut être d'induire ou d'inhiber l'angiogenèse, mais aussi de faciliter la progression des néovaisseaux dans la matrice extracellulaire en dégradant celle-ci et/ou en favorisant l'adhésion des cellules endothéliales à cette matrice pour permettre leur migration.

L'interaction entre tous ces acteurs se fait selon une orchestration spatiale et temporelle précise difficile à élucider.

On peut voir cependant deux grandes phases : celle de l'induction du processus et celle du processus lui-même.

### **A.3.3 Induction de l'angiogenèse**

Cette phase a pour unique objectif d'activer localement certaines cellules endothéliales quiescentes de la paroi capillaire. Cette activation permet aux cellules endothéliales d'acquérir le phénotype angiogénique (turnover rapide, prolifération, différenciation, migration) nécessaire à la mise en place des néovaisseaux.

Chez l'adulte, l'angiogenèse est active lors des processus de reproduction (cycle utérin, développement embryonnaire, placentaire...) et lors des phénomènes de réparation tissulaire et de cicatrisation. L'angiogenèse induite est essentiellement une angiogenèse par bourgeonnement qui se met en place à partir de capillaires ou de vaisseaux matures en réponse à un signal d'appel émanant d'un groupe de cellules (exemple : l'embryon, les tumeurs, un site de lésions tissulaires, un site ischémique) pour lequel un apport nutritionnel supplémentaire (oxygène, nutriments) est indispensable.

L'angiogenèse physiologique est induite par différents phénomènes isolés ou simultanés : ce sont **l'altération de la membrane basale vasculaire, la surproduction de l'angiopoétine-2, l'hypoxie** et la **réaction inflammatoire**. Ces phénomènes sont très ponctuels et par conséquent leur effet pro-angiogénique l'est également et cesse en quelques jours pour la cicatrisation ou quelques semaines ou mois pour la reproduction.

Dans le cas de l'angiogenèse tumorale, la plupart des phénomènes pro-angiogéniques sont retrouvés simultanément et stimulent sans relâche l'angiogenèse tout au long de la croissance tumorale. L'angiogenèse tumorale ne cesse jamais.

Pour comprendre cette angiogenèse tumorale, nous abordons tout d'abord la mécanistique physiologique des 4 principaux phénomènes inducteurs de l'angiogenèse.

#### **A.3.3.1 Induction par altération de la membrane basale vasculaire**

Comme nous l'avons décrit plus haut, la membrane basale vasculaire par sa composition, l'assemblage spontané de ses constituants et son interaction avec la cellule endothéliale garantie la quiescence des cellules endothéliales. Mais elle conserve néanmoins en elle un potentiel pro-angiogénique.

Sa rupture ou le plus souvent son attaque protéolytique par les métalloprotéases matricielles (MMPs) déstabilise l'équilibre entre les signaux pro et anti-angiogéniques émis par cette membrane. L'assemblage de ces composants se modifie, ce qui masque les domaines cryptiques anti-angiogéniques et libère le b-FGF lié et stocké sous forme inactive au perlecan. A cela se rajoute, une diminution de la capacité des cellules endothéliales à se fixer à cette membrane basale ce qui démasque leurs récepteurs pro-angiogéniques (VEGFR et bFGFR). (49).

La cellule endothéliale ne reçoit par conséquent plus le signal globalement anti-angiogénique et s'active alors afin d'acquérir un phénotype angiogénique.

#### **A.3.3.2 Induction par surproduction de l'angiopoïétine 2**

L'état quiescent de la cellule endothéliale dépend, comme on l'a décrit au chapitre A.2.1, du récepteur Tie-2 et du rapport de concentration entre l'agoniste : l'angiopoïétine-1 (Ang-1) et l'antagoniste : l'angiopoïétine -2 (Ang-2).

Une surproduction d'angiopoïétine-2 aux abords du récepteur Tie-2 peut être due à

- une libération accrue par la cellule endothéliale quiescente du fait de la lésion de celle-ci ou de la perte de contact avec la cellule endothéliale voisine,
- une libération par d'autres cellules environnantes comme les macrophages lors de leur recrutement inflammatoire ou hypoxique. (44).

Majoritaire, l'angiopoïétine-2 devient alors fortement antagoniste sur le récepteur Tie-2. Il en résulte un arrêt de la sécrétion du PDGF-BB et à l'inverse une augmentation de la sécrétion de la métalloprotéase matricielle-2 (MMP-2) par la cellule endothéliale avec pour effet respectif un décollement des péricytes et la dégradation de la membrane basale. La dégradation de la membrane basale et le décollement des péricytes ne permettent plus le maintien du signal anti-angiogénique et rendent la cellule endothéliale sensible aux facteurs pro-angiogéniques. Elle acquiert alors un phénotype angiogénique.

Dans le cas des cellules souches hématopoïétiques, une mécanistique similaire est retrouvée. Elles sont quiescentes lorsqu'elles sont, sous la dépendance de Tie-2, accolées à l'os. Mais en présence d'un excès d'angiopoïétine-2, elles se décollent, s'activent, se différencient et prolifèrent (28).

### ***A.3.3.3 Induction par l'hypoxie***

L'hypoxie résulte d'une pression tissulaire en oxygène trop basse. Ceci peut être due à une surconsommation du tissu en O<sub>2</sub> et/ou un apport sanguin tissulaire mécaniquement insuffisant.

L'hypoxie stimule l'expression de molécules pro-angiogéniques par trois mécanismes différents (18, 31, 57, 78). Deux dépendent d'HIF ou facteur de transcription hétérodimérique induit par l'hypoxie (Hypoxia induced factor) qui active la transcription soit de manière directe (le plus physiologique) soit de manière indirecte via des molécules ou des changements dans la physiologie cellulaire induits par HIF. Le troisième mécanisme est une activation transcriptionnelle indépendante de HIF.

#### ***◆ Surexpression de molécules pro-angiogéniques par action directe d'HIF-1***

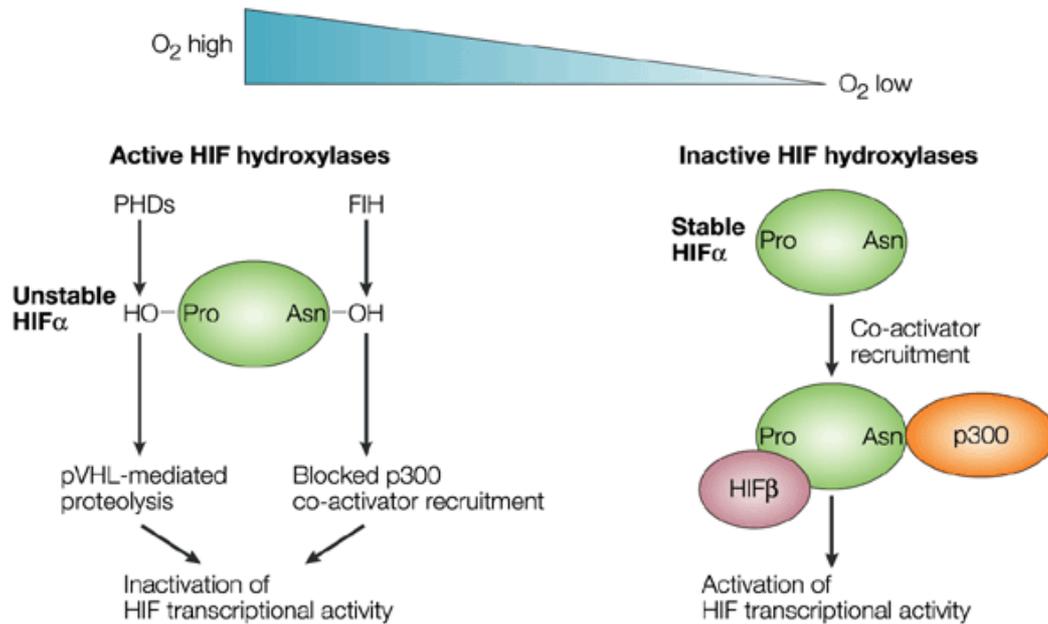
Les facteurs hétérodimériques de transcription induit par l'hypoxie HIF sont composés de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  existe sous trois isoformes HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  et HIF-3 $\alpha$  chez les mammifères alors que la sous-unité  $\beta$ , HIF-1 $\beta$  est unique. Cette dernière est stable et peut se dimériser avec chaque isoforme  $\alpha$ .

Dans la réponse physiologique à l'hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est l'élément clé et sa dégradation ou son activité sont sous la dépendance de l'O<sub>2</sub>.

En effet, pour faire face à de faibles apports en oxygène, la cellule dispose d'un mécanisme sensible aux moindres fluctuations de sa concentration intracellulaire en O<sub>2</sub> (figure 8) qui permet de réguler la concentration intracellulaire d'HIF-1 $\alpha$ . Cette régulation se fait au moyen d'hydrolases spécifiques, la PHD (ou prolyl hydroxylases domains) et la FIH (ou factor inhibiting HIF ou asparaginyl hydroxylases) (16).

Dans des conditions normoxiques (schéma de gauche figure 8), les hydroxylases PHD et FIH limitent l'expression de HIF-1 $\alpha$  et l'inactivent. HIF-1 $\alpha$  est rendu instable par une hydroxylation d'un résidu proline dans le cytosol sous l'action des PHD. Cette hydroxylation permet ensuite la protéolyse d'HIF-1 $\alpha$  par le suppresseur de tumeur von-Hippel-Lindau (VHL). Par ailleurs, FIH hydroxyle HIF-1 $\alpha$  sur un résidu asparagine Asn 851 qui bloque ainsi le recrutement dans le noyau du co-activateur CBP/p300 et par cela l'activité

transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$ . En présence d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  a donc une demi-vie très courte ou est rendu inactif.<sup>1</sup>



**Figure 8 : Contrôle de l'expression de HIF par la pression tissulaire en oxygène.**  
(tiré de Christopher J et al, 2004)

En situation d'hypoxie (schéma de droite, figure 8), par manque de leur substrat (l'O<sub>2</sub>) les hydroxylases sont inactives, HIF-1 $\alpha$  est alors stable et s'accumule. Il forme un hétérodimère dans le noyau avec la sous-unité HIF-1 $\beta$  et en interaction avec le coactivateur CBP/p300<sup>2</sup> peut jouer le rôle de facteur de transcription pour différents gènes cibles dotés de la séquence HRE (Hypoxia Response Element) ou d'une séquence similaire. Ces gènes cibles HRE peuvent coder pour les différentes réponses à l'hypoxie que sont le VEGF (Vascular endothelial growth factor), l'EPO (erythropoïétine), l'i-NOS (nitric oxyde synthetase inductible), etc (Figure 7)(31). La stabilité et l'activité de HIF-1 $\alpha$  sont donc physiologiquement déterminées.

Dans le contexte précis de l'angiogenèse, l'hypoxie permet une accumulation d'HIF-1 $\alpha$  qui stimule l'expression de nombreuses molécules pro-angiogéniques au niveau de gènes HRE tels que VEGF-A, VEGFR-1 (Flt-1), EPO, eNOS mais également au niveau de gènes

<sup>1</sup> HIF-2 $\alpha$  appelé aussi HLF (HIF-1 $\alpha$ -like factor) ou EPAS-1 (endothelial PSA domain protein-1) est régulé de la même manière mais sa sensibilité à l'oxygène est moindre, elle est donc stable dans les conditions normoxiques (Fong 2008)

<sup>2</sup> Cette interaction est positivement régulée par mTOR (cible de la rapamycine) (Fong 2008) et négativement régulée par p53 et CITED2

pour lesquels la séquence HRE n'a pas encore été identifiée tels que b-FGF, PDGF-BB, PlGF, Ang-1, Ang-2, Tie 2 pour les plus connus. Le tableau 1 est un récapitulatif des molécules pro-angiogéniques surexprimées en réponse à l'hypoxie et de leur dépendance à HIF.

Angiogenic genes	Hypoxia response	HRE	HIF-1 target
<i>VEGF-A</i>	Yes	Yes	Yes
<i>VE-Cadherin</i>	No	Yes	No
<i>Epo</i>	Yes	Yes	Yes
<i>Flt-1</i>	Yes	Yes	Yes
<i>Flk-1</i>	Yes/No	HRE-like	No
<i>PLGF</i>	Yes/No	Likely	Likely
<i>eNOS</i>	Yes	Yes	No
<i>Tie-2</i>	Yes	ND	No
<i>Angiopoietin-1</i>	Yes/No/Down	ND	Likely
<i>Angiopoietin-2</i>	Yes/No/Down	ND	Likely
<i>SDF-1</i>	Yes	Yes	Yes
<i>CXCR-4</i>	Yes	Yes	Yes
<i>bFGF</i>	Yes/No	ND	Likely
<i>Endothelin-1</i>	Yes	Yes	Yes
<i>TGF-<math>\beta</math>1</i>	Yes	ND	No
<i>ORP150</i>	Yes	ND	ND
<i>COX-2</i>	Yes	Yes	Yes
<i>Sphingosine Kinase-1</i>	Yes	Yes	ND
<i>Osteopontin-1</i>	Yes	ND	Likely
<i>PDGF-B</i>	Yes/No	ND	Likely
<i>IGF-1</i>	Yes	ND	Likely
<i>IL-8</i>	Yes	ND	(NF $\kappa$ B/AP-1)
<i>MMP-9</i>	Yes	ND	ND
<i>EC-VEGF</i>	Yes	Yes	ND

**Tableau 1 : Récapitulatif des molécules pro-angiogéniques exprimées en réponse à l'hypoxie.**

La colonne HRE précise les gènes contenant la séquence HRE. La colonne HIF-target, précise les gènes dont l'expression est sous la dépendance de HIF-1. (ND : non déterminé) (tiré de Fong et al, 2008)

#### ◆ *Surexpression de molécules pro-angiogéniques par action indirecte d'HIF-1*

L'expression de certains gènes pro-angiogéniques peut être régulée par d'autres facteurs de transcription qui agissent soit pour collaborer avec HIF-1 soit pour contrer son action. Ainsi le facteur transcriptionnel c-Myc par exemple agit en collaboration avec HIF-1 directement sur l'ADN pour activer l'expression du gène VEGF-A. D'autres comme STAT3 stimulent l'expression de VEGF-A en formant un complexe avec HIF-1 et CBP. A l'inverse, certains

comme AMPL-1 interagissent directement avec HIF-1 et diminuent son activité transcriptionnelle sur le gène VEGF-A. La tableau 2 récapitule l'essentiel des facteurs de transcription qui interfèrent positivement ou négativement avec HIF-1.

Transcription factors	Effect on HIF targets	Target genes	Mechanisms
c-Myc	+	<i>VEGF-A, PDK-1 Hexokinase-2</i>	DNA Binding
Runx-1/AML-1	-	<i>VEGF-A, Glut-1</i>	Interacts with HIF-1 $\alpha$
Id-1	+	<i>VEGF-A</i>	Promotes HIF-1 $\alpha$ /CBP interaction
JunB	+	<i>VEGF-A</i>	DNA Binding
Ets-1	+	<i>Flk-1, VE-Cadherin</i>	DNA Binding
Sp1	+	<i>VEGF-A</i>	DNA Binding
STAT3	+	<i>VEGF-A</i>	Forms complex with HIF-1 and CBP
CBP/p300	+	<i>VEGF-A, Epo</i>	Interacts with HIF- $\alpha$
CITED-2	-	<i>VEGF-A</i>	Inhibits HIF-1 $\alpha$ /CBP interaction
p53	-	<i>VEGF-A, Epo</i>	Inhibits HIF-1 $\alpha$ /CBP interaction
NF $\kappa$ B	+	<i>IL-8</i>	AP1 dependent
NEMO	+	(HRE-Luc reporter)	Promotes HIF-2 $\alpha$ /CBP, but not HIF-1 $\alpha$ / CBP interaction
Smad3	+	<i>VEGF-A Epo</i>	DNA binding, Interaction with HIF-1 $\alpha$ and Sp1

**Tableau 2 : Régulation des gènes cibles de HIF-1 par d'autres facteurs de transcription**

Les colonnes « effect on HIF targets » et « target genes » précise l'effet des facteurs de transcription sur l'activité transcriptionnelle de HIF-1 pour des gènes cibles précis : + = régulation positive, - = régulation négative. La colonne « mechanisms » précise le mécanisme par lequel le facteur de transcription interfère sur l'activité de HIF ; « DNA binding » précise que le facteur de transcription agit en se fixant sur son propre site de fixation à l'ADN. (tiré de Fong et al, 2008)

#### ◆ *Surexpression de molécules pro-angiogéniques indépendamment d'HIF-1*

Il a été retrouvé des situations où l'hypoxie permet l'expression de gènes pro-angiogéniques indépendamment de HIF-1, c'est le cas par exemple du facteur transcriptionnel NF $\kappa$ B qui permet (avec l'AP-1 ou activator-protein-1) la surexpression d'Il-8 par les cellules cancéreuses du colon.

Ainsi, l'hypoxie engendre une surexpression de molécules pro-angiogéniques, essentiellement VEGF-A et PlGF chez l'embryon, au sein même de la cellule hypoxique. Le facteur pro-angiogénique libéré massivement par les cellules hypoxiques dans leur environnement constitue un signal d'appel puissant qui pourra activer les cellules endothéliales quiescentes.

#### **A.3.3.4 Induction par une réaction inflammatoire**

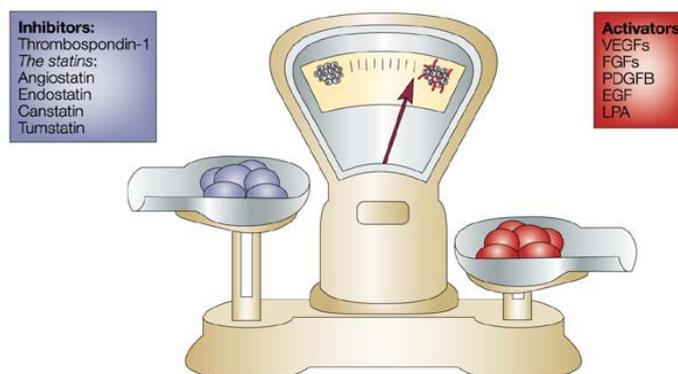
Au cours d'une lésion vasculaire, d'une infection ou dans certaines pathologies inflammatoires, il y a production de nombreuses cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 (IL-1), l'interleukine-6 (IL-6) et le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor). Ces cytokines attirent par chimiotactisme les leucocytes (monocytes, lymphocytes et polynucléaires) qui s'activent et secrètent des facteurs pro-angiogéniques tels que le b-FGF, le VEGF-A mais surtout l'angiopoïétine-2 capable de déstabiliser et d'activer directement les cellules endothéliales quiescentes (43, 44) ainsi que de nombreux précurseurs de métalloprotéases matricielles (pro-MMps).

L'action de l'angiopoïétine-2 au niveau des récepteurs Tie-2, l'altération de la membrane basale par les MMPs, puis l'action des b-FGF et VEGFA sur leur récepteur endothéliaux démasqués, respectivement b-FGFR et VEGFR, induisent l'angiogenèse.

Ces phénomènes d'induction ont tous le même résultat : modifier la balance qui existe entre les agents pro-angiogéniques et les agents anti-angiogéniques

#### **A.3.4 Switch angiogénique**

Il est admis que, chez l'adulte sain, l'angiogenèse est fortement régulée. L'état quiescent des cellules endothéliales est assuré par une balance en légère faveur des agents anti-angiogéniques, c'est à dire un léger excès d'agents anti-angiogéniques comparés aux agents pro-angiogéniques. Il en résulte ainsi globalement un signal anti-angiogénique qui induit et maintient l'état de quiescence des cellules endothéliales.



**Figure 9 : Balance des facteurs pro et anti-angiogéniques en faveur d'un signal pro-angiogénique.**

L'induction de l'angiogénèse (hypoxie, inflammation, altération de la membrane basale, etc), stimule l'expression et/ou le démasquage d'agents pro-angiogéniques mais également le masquage et/ou la baisse de l'expression d'agents anti-angiogéniques. La balance bascule alors en faveur des agents pro-angiogéniques qui deviennent plus nombreux que les anti-angiogéniques. C'est le switch angiogénique (figure 9) Le signal global émis est pro-angiogénique.

Un switch trop sévère est retrouvé dans les pathologies comme le cancer, la polyarthrite rhumatoïde, l'obésité, etc (figure 10)



**Figure 10 : Pathologies dérivant d'un switch angiogénique.**

En cas d'excès d'agents anti-angiogéniques, le switch est dit « OFF ». En cas d'un excès d'agents pro-angiogéniques, le switch est dit « ON ». (adapté de Nyberg et al, 2005)

#### **A.3.4.1 Principaux agents pro-angiogéniques et leurs récepteurs**

Toute cellule y compris les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules immunitaires (lymphocytes (117), polynucléaires neutrophiles et macrophages (31, 44)) sont capables de libérer des agents pro-angiogéniques en réponse à des situations hypoxique ou inflammatoire.

Dans l'angiogénèse physiologique, certains de ces agents vont avoir :

- une action directe, comme les différentes isoformes du VEGF et les angiopoïétines, ciblant spécifiquement et directement les cellules endothéliales,

- une action directe mais non spécifique des cellules endothéliales comme certaines cytokines (IL-8, IL-3) et des peptides pro-angiogéniques ( b-FGF, PDGF-BB) stimulant les cellules péri-vasculaires, ainsi que les métalloprotéases matricielles (MMPs) dégradant la membrane basale et la matrice extracellulaire.

- une action indirecte, comme le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$  qui stimulent les cellules productrices d'agents pro-angiogéniques comme les cellules endothéliales (VEGFs et VEGFRs, IL-8, b-

FGF, PDGF-BB, MMPs) ou les cellules de l'inflammation, essentiellement les macrophages (TNF- $\alpha$ , bFGF, PDGF-BB, VEGF, Angiopoïétine 2, MMPs).

Le tableau 3 récapitule les principaux agents pro-angiogéniques endogènes et leur mécanisme d'action.

Facteurs angiogéniques	Mécanismes d'action
<b>Facteurs de croissance</b>	
VEGF	↑ la perméabilité vasculaire, ↑ la prolifération des CE
PIGF	↑ l'angiogenèse pathologique
bFGF	↑ la prolifération et la migration des CE
Pléiotrophine	↑ la prolifération et la différenciation des CE
PDGF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
HGF/SF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
EGF/TGF $\alpha$	↑ la synthèse de facteurs pro-angiogénique
<b>Système des angiopoïétines</b>	
Ang1 et Tie2	↑ la stabilisation des néovaisseaux, ↓ la perméabilité vasculaire
Ang2 en présence de VEGF	Déstabilise les vaisseaux pour permettre la modification du réseau vasculaire
<b>Médiateurs de l'inflammation et cytokines</b>	
TNF $\alpha$	↑ la différenciation des CE
IL8	↑ la prolifération des CE
IL3	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Prostaglandines E1, E2	↑ la différenciation des CE
IL4	↑ la migration et la différenciation des CE
TGF $\alpha$	↑ la production de molécules de la MEC, du VEGF, de l'IL8 et du PDGF
IGF1	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
<b>Molécules de la MEC, molécules d'adhérence cellulaire, protéases matricielles et inhibiteurs</b>	
Gangliosides, acide hyaluronique, laminine, tenascine, collagène IV	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
uPA et tPA	↑ le remodelage de la MEC, libère et active de nombreux facteurs de croissance
PAI	↑ la stabilisation des néovaisseaux en empêchant la dissolution de la MEC
MMP	↑ le remodelage de la MEC, libère et active de nombreux facteurs de croissance
TIMP	↑ la stabilisation des néovaisseaux en empêchant la dissolution de la MEC
PECAM	Molécules d'adhésion des cellules endothéliales nécessaires à la survie des CE
E-sélectine	Molécules exprimées dans les néovaisseaux associés aux tumeurs, mécanismes inconnus
ICAM3	Molécules exprimées dans les néovaisseaux associés aux tumeurs, mécanismes inconnus
Intégrine $\alpha v \beta 3$ et $\alpha v \beta 5$	Interaction avec la MEC et les protéases, importante pour la migration des CE ; liaison avec le VEGF
<b>Oncogènes tumoraux</b>	
ras	↑ la synthèse du VEGF et des TGF $\alpha$ et $\beta$ , ↓ la synthèse de la TSP1
p53	↑ la synthèse du VEGF, ↓ la synthèse de la TSP1
Von Hippel Lindau	↑ la synthèse du VEGF
<b>Autres</b>	
COX2	↑ la vasodilatation
Angiogénine	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Adrénomédulline	↑ la vasodilatation, la prolifération et la migration des CE
Estrogènes	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Proliférine	↑ la migration des CE

CE : cellule endothéliale.

**Tableau 3 : Liste des principaux facteurs endogènes pro-angiogéniques et mécanismes d'actions**  
(tiré de de Bouard 2005)

Parmi tous ces facteurs pro-angiogéniques, les signalisations physiologiques les plus importantes et également les plus retrouvées dans diverses pathologies sont les signalisations

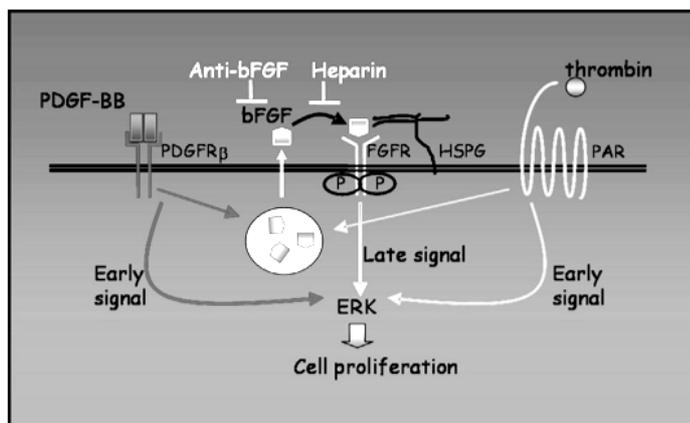
induites par b-FGF, VEGF/VEGFR, Angiopoïétines/Tie-2 et PDGF/PDGFR. Nous décrivons essentiellement ces quatre signalisations pro-angiogéniques.

#### ◆ *Signalisation par b-FGF*

Les FGFs ou Fibroblast Growth Factors constituent une famille de plus de vingt facteurs de croissance fixant l'héparine et qui agissent sur de nombreux types cellulaires.

Dans le cadre de l'angiogenèse, le plus actif d'entre eux est le b-FGF (ou basic Fibroblast Growth Factor, PM : 18 kDa). Il peut être synthétisé essentiellement par les fibroblastes et les macrophages mais également par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (66, 79).

Sa sécrétion hors de la cellule dépend d'une stimulation par le PDGF-BB ou la thrombine (figure 11) (66).



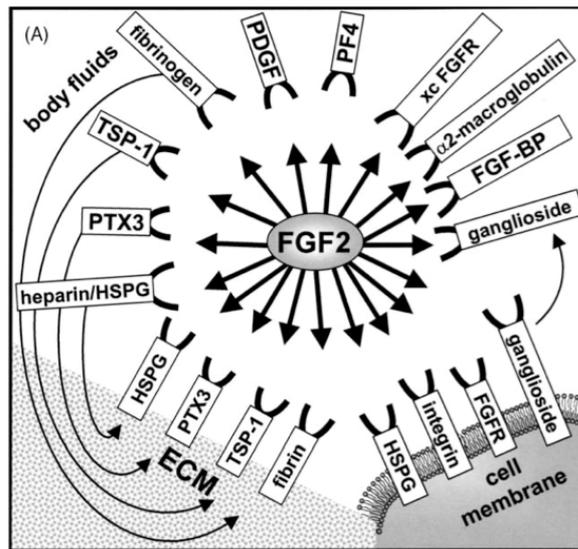
**Figure 11 : Libération de b-FGF par une cellule périovasculaire (cellule musculaire lisse) dans la matrice extracellulaire par action de la thrombine et du PDGF-BB.**

HSPG : protéoglycane à sulfate d'héparane (syndecan-4 ici) est un corécepteur du récepteur à b-FGF (FGFR), il permet d'oligomériser b-FGF et de dimériser FGFR. L'héparine ou des anticorps anti-b-FGF peuvent fixer b-FGF et inhiber son action. (tiré de Millette et al, 2006) :

#### ◇ *Interactions de b-FGF avec les liquides biologiques, la M.E.C. et la surface cellulaire endothéliale*

b-FGF interagit avec de très nombreuses molécules tant membranaires que libres dans les fluides ou encore fixées à la matrice extracellulaire comme le montre la figure 12.

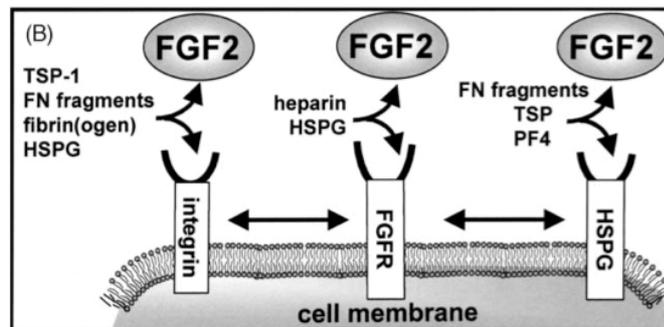
Il exerce une activité pro-angiogénique sur la cellule endothéliale par l'intermédiaire de différents récepteurs de surfaces endothéliales principalement les HSPG (protéoglycane à héparane-sulfate), les intégrines  $\alpha\beta3$  ou leurs récepteurs spécifiques FGFR-1 et 2 (ou Fibroblast Growth Factors Receptor)( figures 11 et 12).



**Figure 12 : Types de molécules fixant b-FGF (ou FGF-2).**

b-FGF est capable de se fixer à des protéines, des polysaccharides ou des lipides présents dans les liquides biologiques, associés à la matrice extracellulaire ou ancrés à la membrane des cellules endothéliales. L'activité biologique de b-FGF est renforcée ou inhibée selon que la molécule est libre ou fixée à la matrice ( cas de Thrombospondine-1(TSP-1), Fibrinogène, HSPG, etc) (tiré de Presta et al, 2005).

Certaines molécules fixant b-FGF comme la thrombospondine-1 (TSP-1), les HSPG libres, l'héparine, le PF4 (ou Facteur plaquettaire 4) peuvent interagir avec ces différents types de récepteurs endothéliaux pour moduler positivement ou négativement l'activité pro-angiogénique du b-FGF (figure 13)

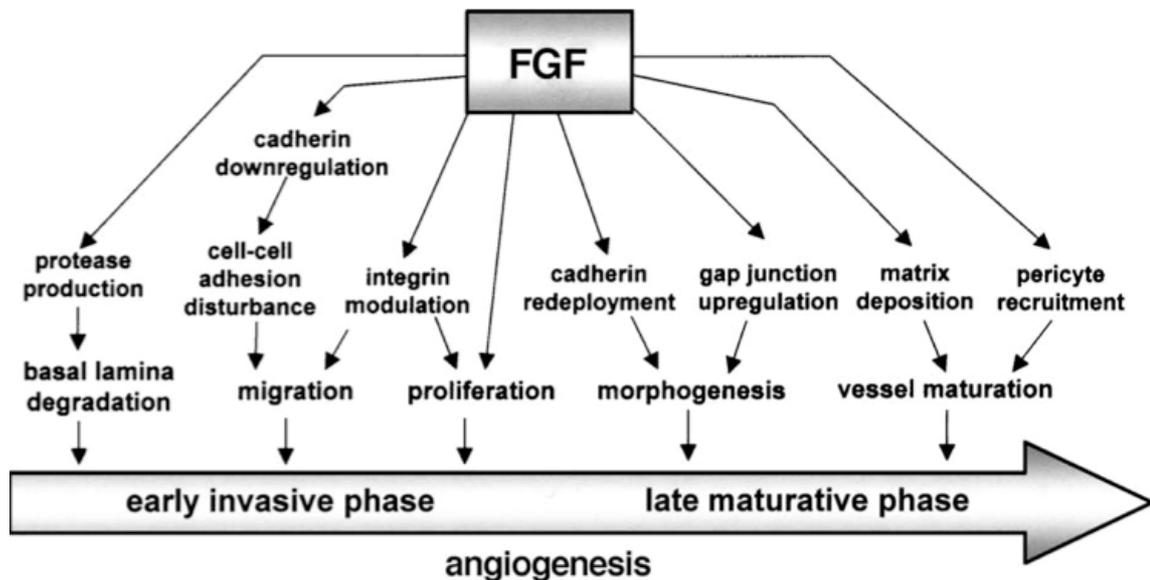


**Figure 13 : Agonistes ou antagonistes potentiels sur les différents récepteurs cibles endothéliaux de b-FGF.**

(tiré de Presta 2005)

◇ *b-FGF et l'angiogénèse*

b-FGF est impliqué à toutes les niveaux de l'angiogénèse comme le montre la figure 14. Il induit le phénotype angiogénique dans la cellule endothéliale. La cellule endothéliale libère alors les MMPs pour dégrader la membrane plasmique, n'exprime plus les cadherines responsables du contact cellule – cellule mais exprime des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  lui permettant de migrer et de proliférer.



**Figure 14 : Représentation schématique des événements pro-angiogéniques attribués au b-FGF.**

Ces événements concernent directement la cellule endothéliale et contribuent à lui donner son phénotype angiogénique. (tiré de Presta et al 2005)

b-FGF régule également très finement la production des activateurs du plasminogène uPA et tPA nécessaires à l'activation des protéases matricielles et à la dégradation de la matrice extracellulaire pour permettre le cheminement des cellules endothéliales.

b-FGF induit ensuite la formation de tubes capillaires (morphogénèse) non fenêtré, la mise en place des jonctions entre les cellules. Les cellules endothéliales entrent alors progressivement dans un phénotype de quiescence qui sera renforcé par la synthèse de la membrane basale et le recrutement des péricytes (via PDGF-BB).

L'activité pro-angiogénique de b-FGF est spatio-temporelle et dépend de son affinité pour différentes molécules pro ou anti-angiogéniques.

Par ordre de décroissance, l'affinité de b-FGF pour ces molécules est : HSPG > fibrinogène >  $\alpha 2$  macroglobuline > Héparine > PF4 > TSP-1 > PDGF-BB >  $\alpha v \beta 3$  > FGFR. (79). Cette affinité confère, par conséquent, aux protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) permettant de stocker le b-FGF, un rôle primordial dans la régulation de l'angiogenèse.

#### ◆ *Signalisation VEGFs / VEGFRs*

##### ◇ VEGF

La famille des VEGF (ou Vascular Endothelial Growth Factor) chez les mammifères comprend 5 membres, VEGF-A, -B, -C, -D et PlGF. Ce sont des protéines fixant l'héparine.

Dans le cadre de l'angiogenèse, VEGF-A est le plus important, il joue un rôle clé à la fois dans la vasculogenèse et dans l'angiogenèse, et doit être exprimé à un niveau basal pour assurer un système circulatoire clos, fonctionnel et stable. VEGF-A existe sous 4 isoformes de 121, 165, 189 et 206 acides aminés. L'isoforme VEGF-A<sup>165</sup> est la forme la plus importante en terme de quantité et d'activité biologique. ( 3, 10, 41, 100).

L'expression du VEGF-A<sup>165</sup> en absence de pathologie est stimulée par l'hypoxie via HIF-1, les oestrogènes et la voie NF-κB entre autres.

◇ *Interactions du VEGF-A<sup>165</sup> avec la MEC et la surface cellulaire*

• *Matrice extracellulaire*

VEGF-A<sup>165</sup> se fixe essentiellement au niveau de la matrice extracellulaire sur les protéoglycanes à héparane sulfaté (HSPG) qui le stocke.

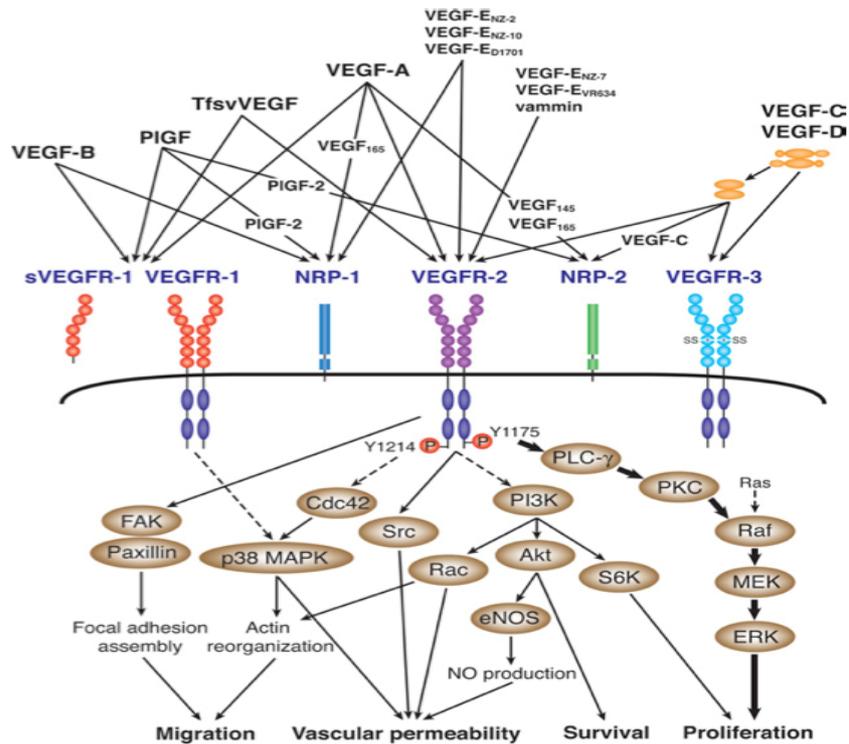
Au niveau cellulaire, il peut se fixer sur ses récepteurs spécifiques VEGFR-1 et VEGFR-2 ou sur leurs cofacteurs de surface : les Neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2) (figure 14) (75,100, 105)

• *VEGFRs*

Ce sont des récepteurs homodimériques transmembranaires à activité tyrosine kinase.

Le VEGFR-1 (codé par le gène *Flt-1*) a une forte affinité pour VEGF-A<sup>165</sup> mais il n'induit que faiblement la prolifération cellulaire. Ses formes membranaires et solubles agissent essentiellement comme régulateur négatif dans l'angiogenèse embryonnaire en diminuant localement la concentration en VEGF-A<sup>165</sup> disponible (105). Il est présent aussi sur la membrane des monocytes et des macrophages, ce qui explique la migration par chimiotactisme de ces populations cellulaires de la moelle vers le site producteur de VEGF-A<sup>165</sup>. Localement, ces cellules libèrent alors de nombreux agents pro-angiogéniques comme l'angiopoïétine-2.

Le VEGFR2 (codé par le gène *Flk1* chez la souris ou *KDR* chez l'humain) a une faible affinité pour VEGF-A<sup>165</sup> mais l'activité biologique qui en résulte est une prolifération cellulaire très importante (figure 15). Il est très impliqué dans l'induction et la progression de l'angiogenèse, ce qui le rend essentiel dans le développement vasculaire embryonnaire.



**Figure 15 : Signalisation VEGF/VEGFR et ses cofacteurs**

Les flèches noires épaissies montrent l'activité biologique principale induite par l'activation du VEGFR-2. (Tiré de Takahashi et al, 2005)

• *Co-récepteurs*

Les co-récepteurs : Neuropiline-1 (NRP-1) et-2 (NRP-2) sont aussi capables de se lier au VEGF-A<sup>165</sup> (ainsi qu'avec PIGF2, VEGF-B et VEGF-C). Ils sont transmembranaires mais leur domaine intracellulaire trop court ne permet pas une transduction directe de signal au sein de la cellule endothéliale. Lorsque le co-récepteur NRP-1 forme un complexe avec le VEGFR2, le signal induit par VEGF-A<sup>165</sup> est accentué : la prolifération et la migration endothéliales sont augmentées.

Le cofacteur NRP-2 est impliqué dans un processus similaire avec le VEGFR-3 mais uniquement au cours de la lymphangiogenèse (104, 105).

◇ *VEGF-A<sup>165</sup> et cellule endothéliale*

Pour permettre une stimulation angiogénique précise et dirigée sur quelques cellules endothéliales, un gradient de VEGF-A<sup>165</sup> doit être établi autour de ces cellules. Ceci est rendu possible par sa fixation sur la neuropiline 1, cofacteur indispensable des récepteurs VEGFR-2, et sur les HSPG de la matrice extracellulaire (100).

• *Signalisation VEGF-A<sup>165</sup>/ VEGFR-1 et -2 dans la cellule quiescente*

Comme nous l'avons vu avec la signalisation Angiopoïétines / Tie-2, VEGF-A<sup>165</sup> doit être présent à une concentration basale pour maintenir l'intégrité du vaisseau. Par action sur les récepteurs constitutifs VEGFR1, il permet à la cellule endothéliale quiescente de réguler sa synthèse et sa sécrétion de protéases matricielles, sa migration ainsi que la perméabilité vasculaire.

• *Signalisation VEGF-A<sup>165</sup>/ VEGFR-2 dans l'angiogenèse*

Lorsque VEGF-A<sup>165</sup> se lie massivement aux récepteurs VEGFR-2 de la cellule endothéliale, la phosphorylation des deux sites tyrosine kinases intracellulaires du récepteur est induite, ce qui aboutit à une stimulation importante de la prolifération cellulaire. Le site Tyr 1175 est le plus actif et stimule la prolifération endothéliale via les voies phospholipases C- $\gamma$ , PKC, et celles qui en découlent c-raf-MEK-ERK. L'autre site Tyr 1214 moins actif agit via les voies Pi3K/S6K. Il stimule aussi la migration et la morphogenèse des tubules capillaires via les voies P38/MAPK et le système FAK qui activent respectivement le réarrangement du cytosquelette (actine) dans la cellules endothéliale et l'expression des intégrines nécessaires à la migration.

La perméabilité vasculaire, quant à elle est augmentée par une discontinuité endothéliale avec désorganisation des protéines de jonctions endothéliales comme les VE-cadherines et les occludines (105), mais également par activation de la voie Pi3K/AKT qui stimule la production du vasodilatateur endogène, le NO (ou Nitric Oxyde). L'ensemble des voies activées sont représentées dans la figure 14. Ces voies induisent la prolifération, la migration et la survie endothéliale. Elles augmentent également la perméabilité vasculaire.

Alors que le b-FGF permet la mise en place de capillaires sanguins à endothélium épais non fenêtré et à perméabilité restreinte aux caveolae, le VEGF-A<sup>165</sup> quant à lui permet la mise en place de capillaires sanguins à la structure désorganisée et à l'endothélium fortement fenêtré. Cette structure a montré une très forte perméabilité vasculaire à la ferritine (13).

◆ *Signalisation Angiopoïétines / Tie-2*

Comme nous l'avons déjà largement décrit au chapitre A.2.1 au sujet du phénotype de quiescence de la cellule endothéliale, l'angiopoïétine-1 en excès par rapport à l'angiopoïétine-2 assure via le récepteur Tie-2, le maintien de la cellule dans un phénotype de quiescence. Dans le cas de l'angiogenèse, les macrophages recrutés par le VEGF-A<sup>165</sup> libèrent localement un excès d'angiopoïétine-2. Cet excès agit comme antagoniste du récepteur Tie-2 et inhibe la

phosphorylation de ces sites tyrosines kinases. Il en résulte une perte de contact entre les cellules endothéliales et une baisse de l'expression de PDGF-BB nécessaire au recrutement des péricytes. Le capillaire est déstabilisé, les cellules endothéliales locales ne sont plus maintenues dans leur phénotype de quiescence et libèrent les MMPs pour dégrader la membrane basale. Elles deviennent accessibles au VEGF-A<sup>165</sup> et au b-FGF libérés par la membrane basale.

#### ◆ *Signalisation PDGF-BB / PDGFR*

Le PDGF (Platelet derived Growth Factor) est un constituant naturel du sérum. Il existe plusieurs isoformes (AA, BB et AB) et deux récepteurs PDGFR- $\alpha$  et PDGF- $\beta$ . L'homodimère PDGF-BB et son récepteur PDGF- $\beta$  sont les plus impliqués.

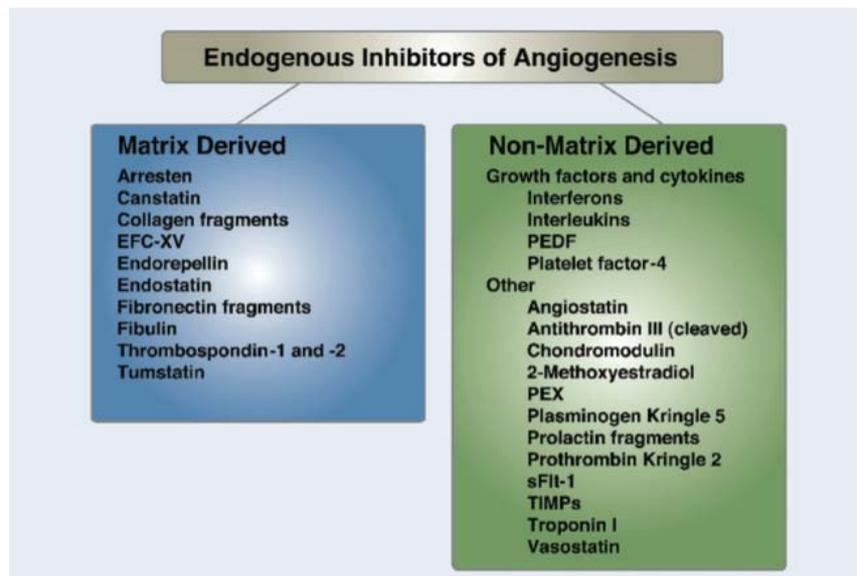
Les cellules endothéliales quiescentes synthétisent et secrètent le PDGF-BB en réponse à l'action de l'angiopoïétine-1 sur Tie-2, afin de recruter les péricytes pour le maintien de la structure du capillaire. Cette sécrétion a lieu également après la mise en place des néovaisseaux (108).

En dehors de ces cellules endothéliales, le PDGF-BB est essentiellement produit par les plaquettes et stocké dans leurs granules  $\alpha$  mais il peut également être exprimé et libéré par les macrophages et les cellules épithéliales en général. Par liaison sur les récepteurs PDGFR- $\beta$  constitutifs des cellules mésenchymateuses et des fibroblastes, le PDGF-BB libéré induit leur mitose, leur prolifération cellulaire et leur différenciation ainsi que leur synthèse d'acide hyaluronique et de collagène. Par interaction avec l'intégrine  $\alpha 3 \beta 1$ , il favorise leur migration le long de la fibronectine, de la laminine et du collagène de type IV au sein de la matrice extracellulaire ou de la membrane basale afin de favoriser la réparation tissulaire (42, 66).

Le PDGF est très impliqué dans le développement embryonnaire ainsi que dans les pathologies impliquant un épaissement tissulaire comme la fibrose, l'athérosclérose, les fibromatoses et les glomérulonéphrites. Une production aberrante de PDGF-BB peut être à l'origine d'un phénotype néoplasique des cellules présentant le récepteur PDGFR (42, 56).

### A.3.4.2 Principaux agents anti-angiogéniques

Ces agents sont très nombreux et leur rôle est d'assurer la quiescence de l'ensemble du système vasculaire en ayant une activité légèrement supérieure à celles des agents pro-angiogéniques. Le tableau 4 regroupe les principaux agents anti-angiogéniques et leur provenance.



**Tableau 4 : Principaux agents anti-angiogéniques et leur provenance.**  
(Tiré de Nyberg et al, 2005)

Certains sont issus de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, qui comportent dans leur structure des fragments peptidiques à activités cryptiques anti-angiogéniques. Ces fragments anti-angiogéniques peuvent être libérés ou démasqués par clivage protéolytique par les métalloprotéases matricielles (MMPs). Le tableau 5 précise ces fragments et les MMPs impliquées.

Molécules de la MEC	Fragments « cryptiques »	Propriétés	Métalloprotéinases ou protéases impliquées
Plasminogène	Angiostatines (K1-K4, K5 ...)	Anti-angiogéniques	MMP-2, -3, -7, -9 et -12
Collagène XVIII	Endostatine	Anti-angiogéniques	MMP-3, -7, -9, -12, -13 et -20
Collagène XV	Restine	Anti-angiogéniques	n. i.
Collagène IVa <sub>1</sub>	Arrestine	Anti-angiogéniques	n. i.
Collagène IVa <sub>2</sub>	Canstatine	Anti-angiogéniques	n. i.
Collagène IVa <sub>3</sub>	Tumstatine	Anti-angiogéniques	n. i.

**Tableau 5 : Fragments protéiques cryptiques anti-angiogéniques de la matrice extracellulaire**

Les fragments anti-angiogéniques sont issus du plasminogène et des différents collagènes de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire après clivage par les MMPs ou autres enzymes (extrait de Gabison et al, 2003)

D'autres circulent librement dans la matrice ou sont stockés comme la thrombospondine-1 et le PF4 (facteur plaquettaire 4), dans les granules  $\alpha$  des plaquettes.

Les principaux agents anti-angiogéniques sont l'endostatine et la tumstatine issues respectivement du clivage des collagènes XVIII et IV, l'angiostatine issue du clivage du plasminogène, ainsi que la thrombospondine-1 et le PF4. Les différents processus angiogéniques inhibés par ces principaux agents anti-angiogéniques sont répertoriés dans le tableau 6 :

<b>Effets biologiques et molécules concernées</b>	<b>Agents anti-angiogéniques</b>
<b><i>Migration</i></b>	
MMPs	Endostatine, PF4
Intégrines	Endostatine, tumstatine, angiostatine, TSP-1
<b><i>Prolifération cellulaire/ Cycle cellulaire stoppé</i></b>	
Voie de signalisation des MAPK	Endostatine,
Arrêt du cycle en G1/S	Tumstatine, angiostatine
Cycline D	Endostatine,
<b><i>Survie / apoptose</i></b>	
Voie de signalisation extrinsèque	Angiostatine, TSP-1,
Voie de signalisation intrinsèque	Endostatine, angiostatine, TSP-1,

**Tableau 6 : Effets biologiques majeurs des principaux anti-angiogéniques endogènes.**  
TSP-1 : thrombospondine-1, (Adapté de Tabruyin et al, 2007 )

#### ◆. *Angiostatine*

L'angiostatine (56 kDa) résulte du clivage du plasminogène par de nombreuses métalloprotéases matricielles (tableau 5). et comprend quatre boucles Kringle. Son action est essentiellement endothéliale en se liant à de multiples cibles membranaires.

Elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales induites le b-FGF (via les kinases 5 cycline-dépendante ou cdk 5) et la migration cellulaire en se fixant aux intégrines  $\alpha v \beta 3$  ; Elle induit l'apoptose des cellules par le biais de nombreuses voies intracellulaires (ATP, caspases, ...) et maintient latent le développement des métastases (10) (tableau 6).

Par ailleurs, l'angiostatine induit l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1, E-selectine.

#### ◆ *Endostatine*

L'endostatine est un inhibiteur de 20 kDa correspondant au fragment C-terminal du collagène de type XVIII. Elle peut être libérée de la matrice extracellulaire par protéolyse ou exposée à la cellule endothéliale par un agencement adéquat de la membrane basale.

Elle a une action très large et très puissante (tableau 6) (10, 70, 116,103).

Sur les cellules endothéliales, l'endostatine est cytostatique en les bloquant dans la phase G1/S de leur cycle cellulaire. Elle induit leur apoptose par inhibition des signaux anti-apoptotiques et activation de certaines voies pro-apoptotiques (caspase 9). Par interaction avec le VEGFR-2 (KDR/*FLK1*) ou les intégrines  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \nu\beta 5$ , elle réduit leur prolifération, leur survie et leur migration. L'endostatine peut interagir également avec les protéoglycanes à héparanes sulfates de surface (HSPG : glypicane -1 et -4) empêchant ainsi la fixation du VEGF ou b-FGF. Elle impose une régulation négative sur le système uPA/uPAR/PAI-1 et inhibe les MMP-2 en formant avec elles un complexe stable.

Sur d'autres cellules, elle peut altérer les gènes régulant positivement l'expression des agents pro-angiogéniques comme le VEGF-A<sup>165</sup>, la MMP-9 et HIF-1 et ceux régulant négativement l'expression d'agents anti-angiogéniques comme la thrombospondine-1 (TSP-1).

Dans le cas des tumeurs, son relargage continu par les cellules endothéliales *in vivo* fait régresser complètement la tumeur primaire vers un état d'îlot microscopique latent. L'endostatine est donc non seulement capable de maintenir la latence tumorale mais aussi de provoquer la régression tumorale (10).

#### ◆ *Tumstatine*

C'est un fragment de 28 Kda du collagène XIV à action angiostatique. Il se fixe aussi à l'intégrine  $\alpha \nu\beta 3$  ce qui inhibe l'activation des voies FAK, PI3K, PKB et mTor et par cela, la prolifération des cellules endothéliales en bloquant leur cycle en G1 et en induisant l'apoptose via la caspase 3. Il inhibe spécifiquement la synthèse protéique des cellules endothéliales. (103).

#### ◆ *Facteur plaquettaire-4*

Le facteur plaquettaire-4 (PF-4) est un polypeptide de 7 kDa exprimé principalement dans la lignée mégacaryocyto-plaquettaire sous forme de tétramères.

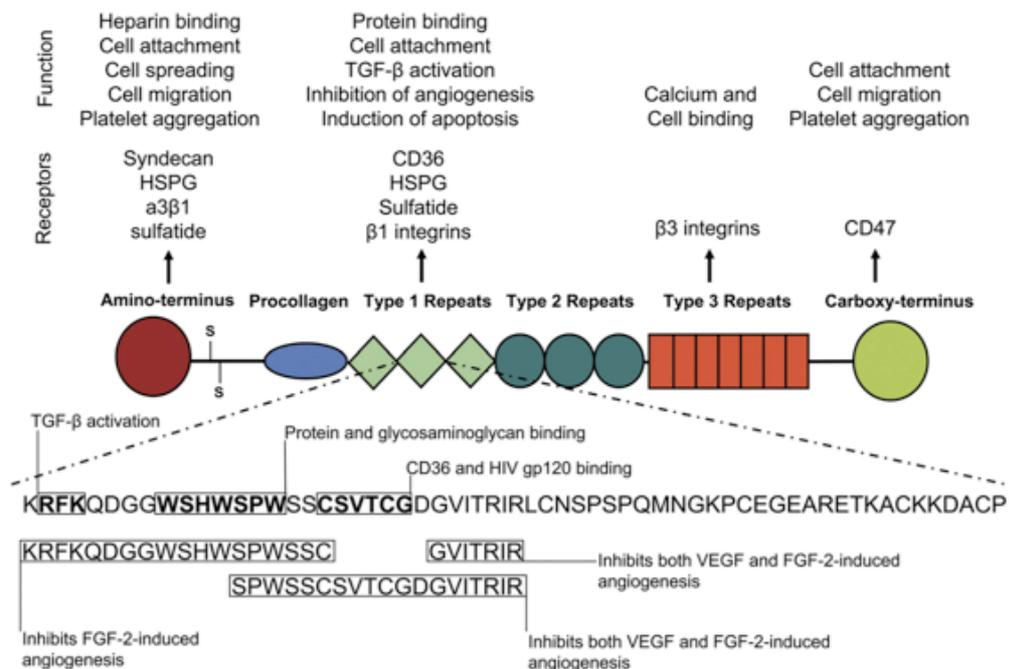
Il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et donc l'angiogenèse par trois mécanismes différents : 1 - par son activité anti-héparine : interaction directe avec les glycosaminoglycanes (GAG) des HSPG. Il empêche ainsi les HSPG d'avoir un effet coopératif avec les facteurs pro-angiogéniques et avec leurs récepteurs ; 2 - par interaction directe avec b-FGF ou VEGF-A<sup>165</sup> ; 3 - par activation des récepteurs inhibiteurs membranaires endothéliaux.

Il inhibe aussi indirectement la migration des cellules endothéliales en bloquant la surexpression des MMP-1 et MMP-3 induite par la thrombine.

PF-4 induirait l'expression des E-Selectines via NFκB. (9, 103)

### ◆ *Thrombospondine-1*

La thrombospondine-1 (TSP-1) appartient à une famille de glycoprotéines produites par de nombreuses cellules. Elle n'est issue d'aucun clivage. Elle est stockée en grande partie dans les plaquettes où elle est complexée avec le TGF-β, mais est également retrouvée dans la matrice extracellulaire. Elle possède de très nombreux domaines qui lui confèrent une activité très complexe (figure 17) (86).



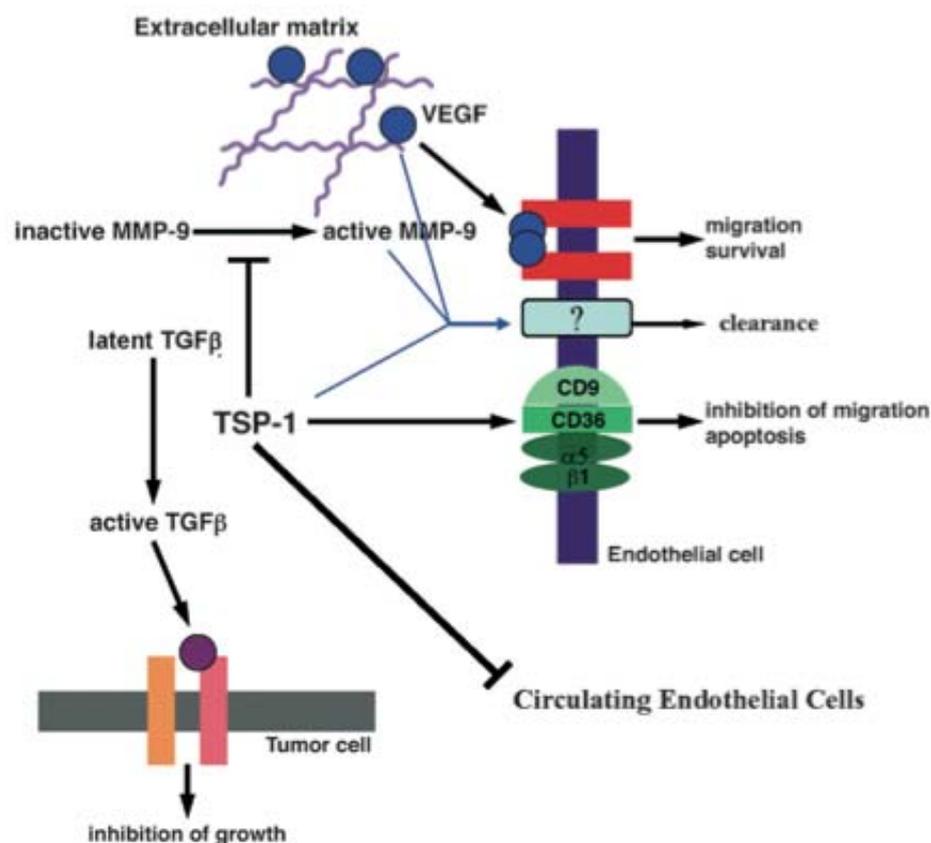
**Figure 16 : Structure de la thrombospondine-1 (TSP-1)**  
TSR = type-1 repeats. (Tiré de Zhang et al, 2007)

La TSP-1 est un inhibiteur et régulateur puissant de l'angiogenèse. Il joue un rôle primordial dans le *switch* angiogénique ( 86, 103, 118). Son expression est activée par action du gène suppresseur de tumeur p53.

Son activité anti-angiogénique est portée par son domaine procollagène au niveau de la séquence TSR (type-1 repeat séquence) qui peut interagir avec de nombreux récepteurs pour activer des voies de signalisation très différentes. Mais la TSP-1 agit également sur l'activité d'autres régulateurs comme le TGF- $\beta$  et le MMP9.

Via le CD36 endothélial, la TSP-1 inhibe la migration cellulaire y compris celle induite par VEGF-A<sup>165</sup> et induit l'apoptose . Elle possède une séquence RGD (Arg-Gly-Asp) dans sa région TSR (type 1 repeats) qui lui permet de se fixer aux intégrines  $\alpha v \beta 3$  comme l'angiostatine, l'endostatine ou la tumstatine .

Elle inhibe directement le VEGF-A<sup>165</sup>, le b-FGF et les MMP-9 en s'y fixant (86, 103, 118). Par ailleurs, la TSP-1 peut réduire le nombre de progéniteurs endothéliaux circulants (86).



**Figure 17 : Récapitulatifs des différents modes d'action de la thrombospondine-1.**  
(Tiré de Zhang et al, 2007)

#### **A.3.4.3 Stockage et disponibilité des différents agents pro-et anti-angiogéniques**

Les différents agents pro ou anti-angiogéniques inclus dans la balance angiogénique sont produits par les cellules en situation d'hypoxie ou en situation inflammatoire, les cellules endothéliales, les cellules stromales ou sont des fragments à activité cryptique de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire.

La plupart de ces agents pro-angiogéniques ne restent pas solubles et libres dans la matrice extracellulaire.

Les agents à actions directes comme le VEGF-A<sup>165</sup>, le PlGF, les FGFs, le PDGF se fixent aux sulfates d'héparane (HS) des protéoglycanes (HSPG) situés dans la matrice extracellulaire ou sur les membranes cellulaires. Ceux à actions indirectes comme le TGF- $\alpha$  et  $\beta$ , l'IGF se lient à des protéines de cette matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire constitue ainsi un véritable réservoir de facteurs de croissance et permet la mise en place de gradients d'agents pro-angiogéniques entre l'émetteur de l'agent et sa cible.

L'action précise des MMPs et du système uPA/uPAR/PAI-1 sur cette matrice peut aboutir localement à la libération d'un seul facteur de croissance spécifique. Ainsi la dégradation du perlécane (HSPG) de la membrane basale par MMP-1 ou MMP-3 permettra la libération du b-FGF.

#### **◆ Rôle des protéoglycanes aux sulfates d'héparane (HSPG)**

La présence des protéoglycanes aux sulfate d'héparane à la surface des cellules (syndecane) et dans la matrice extracellulaire (perlecane) est critique dans de très nombreux processus physiologiques comme l'angiogenèse. La fonction biologique des HSPG vient du fait qu'ils ont la capacité de fixer, via les motifs sulfate surtout mais également via certains motifs carboxyl de l'héparane, de très nombreuses molécules comme les facteurs de croissance, les cytokines et chimiokines mais également les protéines matricielles, les protéases et leurs inhibiteurs.

Dans le cas de l'angiogenèse, les principaux agents pro-angiogéniques associés aux HSPG sont récapitulés dans le tableau 7. Le VEGF-A ne fait pas exception et sa liaison aux HS affecte sa diffusion, sa demi-vie ainsi que son interaction avec ses récepteurs à tyrosine kinase, les VEGFRs.

FGFs	Fibroblast growth factors	PDGF	Platelet-derived growth factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Pleiotrophin	
PIGF	Placental growth factor	PF-4	Platelet factor-4
Hb-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	IL-8	Interleukin-8 (IL-8)
HGF	Hepatocyte growth factor	MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
TGF- $\beta$	Transforming growth factor-beta	IP-10	Interferon-g-inducible protein-
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma	HIV-Tat	HIV-transactivating factor

**Tableau 7 : Liste des facteurs de croissance, cytokines et chimiokines fixant l'héparine et acteurs dans l'angiogenèse.**

([http:// 5](http://5))

La biodisponibilité et donc l'activité des différentes molécules est très finement contrôlée par le fait qu'elles peuvent exister sous forme soluble ou fixée aux HSPG associés à la MEC (ex : perlecane) ou à la surface des cellules (ex : syndecane).

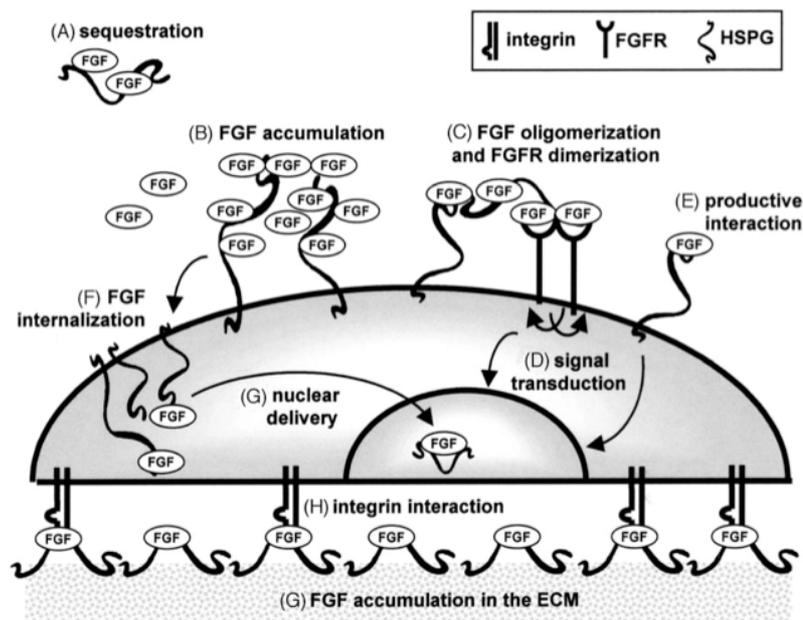
Dans le cas de b-FGF, l'interaction b-FGF-syndecane membranaire inhibe l'activité mitogénique de b-FGF tandis que l'association b-FGF-perlecane matricielle permet l'interaction avec les intégrines endothéliales basales qui activent alors la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (figure 18) (79).

Les différentes fonctions des HSPG sont de

- stabiliser les molécules fixées en les protégeant de leur protéolyse
- moduler leur disponibilité et l'accès à leur récepteur spécifique en modifiant leur conformation (ex b-FGF).

- contrôler la signalisation intracellulaire induite par certains facteurs de croissance puisque les HSPG transmembranaires peuvent interagir directement avec les récepteurs spécifiques de ces facteurs.

La fixation des facteurs de croissance à l'un ou l'autre des HSPG est définie par les groupements sulfate et par des séquences oligosaccharidiques particulières des HSPG.



**Figure 18 : Conséquences biologiques sur l'endothélium de l'interaction b-FGF/HSPG.**

**A :** b-FGF est séquestré par HSPG ou par l'héparine dans la matrice extracellulaire. **B :** La liaison de b-FGF au HSPG de la membrane endothéliale permet d'augmenter la concentration de b-FGF dans l'environnement endothélial et d'établir un gradient. **C :** HSPG favorise l'oligomérisation de b-FGF qui à son tour permet la dimérisation de FGFR et donc la transduction d'un signal. **D :** HSPG/b-FGF peut activer directement FGFR. **E :** HSPG intervient pour permettre l'internalisation de b-FGF et son action directement au niveau du noyau. **H :** HSPG de la membrane basale ou matrice extracellulaire peut présenter le b-FGF aux intégrines endothéliales pour permettre une adhésion de la cellule au substrat. (tiré de presta et al, 2005)

L'activité des agents fixant les HSPG dépend de différents systèmes : celui de

- **la plasmine.** Cette protéase à sérine dégrade la partie protéique du HSPG enchassée dans la membrane, libérant ainsi un complexe actif : facteur de croissance / HSPG. Dans le cas du b-FGF ce complexe b-FGF / HSPG préserve et améliore l'activité pro-angiogénique du b-FGF et assure sa diffusion large dans les tissus et dans la circulation sanguine.

Ce système est étroitement régulé par des cytokines, comme le TGF- $\beta$  et par le b-FGF lui même, qui modulent la synthèse de PA et PAI-1 par la cellule endothéliale. Il est le plus important dans l'angiogenèse pour réguler l'activité des molécules fixant l'héparine.

- **les héparinases, héparanases et héparitinases.** Elles dégradent la partie saccharidique des HSPG immobilisés dans la MEC libérant ainsi le facteur seul (b-FGF) (115).

- **la phospholipase C.** Elle intervient pour libérer le complexe actif b-FGF / HSPG lorsque l'HSPG est ancré à la membrane par l'intermédiaire d'une GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol).

- **les glycosaminoglycanes (GAG) libres** qui détournent les facteurs de croissance des HSPG membranaires. L'affinité de fixation des GAG est, dans l'ordre décroissant :

héparine > sulfate d'héparane > dermatane sulfate.

L'acide hyaluronique et les chondroïtines sulfates ne peuvent fixer ces agents (79).

### ◆ *Rôle de la protéolyse matricielle*

La matrice extracellulaire a longtemps été décrite comme devant uniquement être dégradée pour permettre la progression des néo-vaisseaux mais depuis quelques années, il s'avère que son rôle est beaucoup plus complexe, crucial et dépend de sa protéolyse.

La protéolyse matricielle est primordiale dans le phénomène de l'angiogenèse puisqu'elle permet :

- de déstabiliser la membrane basale et donc d'activer les cellules endothéliales quiescentes
- de dégrader la matrice extracellulaire nécessaire à la migration des cellules endothéliales et à la progression des néo-vaisseaux
- de réguler dans l'espace et dans le temps la concentration et l'activité des différents agents pro et anti-angiogéniques dans le micro environnement de la cellule endothéliale activée afin d'assurer une angiogenèse dirigée, ciblée et contrôlée.

La matrice extracellulaire est un tissu très complexe dans lequel cohabitent des fibres (collagène), des glycoprotéines (laminine), des protéoglycanes, des protéines (fibronectine, plasminogène) mais également différents types cellulaires, les plus importants étant les fibroblastes et les cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes).

Parmi ces fibres ou ces molécules, certaines comme le collagène XV et XVIII, la fibronectine, la laminine, le plasminogène, contiennent des fragments protéiques dits à activité biologique cryptique, c'est-à-dire qu'ils sont masqués au sein de la fibre ou de la molécule et ne peuvent exercer leur activité biologique. Cette activité peut apparaître cependant en cas de changement de conformation ou de protéolyse ciblée.

Pour permettre les événements migratoires, les remaniements matriciels et l'activation des fragments cryptiques nécessaire au processus de l'angiogenèse, il doit se produire une protéolyse matricielle très finement régulée dans le temps et l'espace. Celle-ci est assurée principalement par deux systèmes protéolytiques :

- celui des métalloprotéinases matricielles (MMPs)
- celui des protéases à sérine du système du plasminogène/activateur du plasminogène (PA)

### ◇ Les métalloprotéases matricielles MMPs

L'activité des multiples métalloprotéinases matricielles (MMPs) issues des cellules endothéliales, des fibroblastes et des macrophages essentiellement, confère à la matrice extracellulaire un rôle clé dans l'angiogenèse (58, 94, 102).

Les métalloprotéases matricielles appelés aussi matrixines constituent une famille de plus de 20 endopeptidases à zinc capables de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire ou de la membrane basale. Elles sont synthétisées et secrétées sous une forme de pro-MMps inactives (figure 19). Ces pro-MMps possèdent un peptide signal impliqué dans leur sécrétion, un pro-domaine qui permettra par protéolyse de les activer, un domaine catalytique contenant un atome de zinc et, excepté pour les matrilysines produites surtout par les épithéliums, un domaine hémapexine (PEX) qui constitue un site de liaison à leur inhibiteur tissulaire (les TIMPs ou tissue inhibitor of metalloproteinase), à certaines intégrines et à des récepteurs de surface (94).

Les MMPs sont divisés en 5 familles à structure et substrat spécifique : par ordre croissant de complexité structurale

-**les matrilysines**, produites essentiellement par les épithéliums cancéreux, elles sont constituées de la structure minimale sans site de régulation et dégradent tous les composants de la MEC excepté les collagènes fibrillaires

-**les collagénases**, qui dégradent les collagènes fibrillaires I, II, III, VII et X et peuvent activer les pro-MMP2 et 9

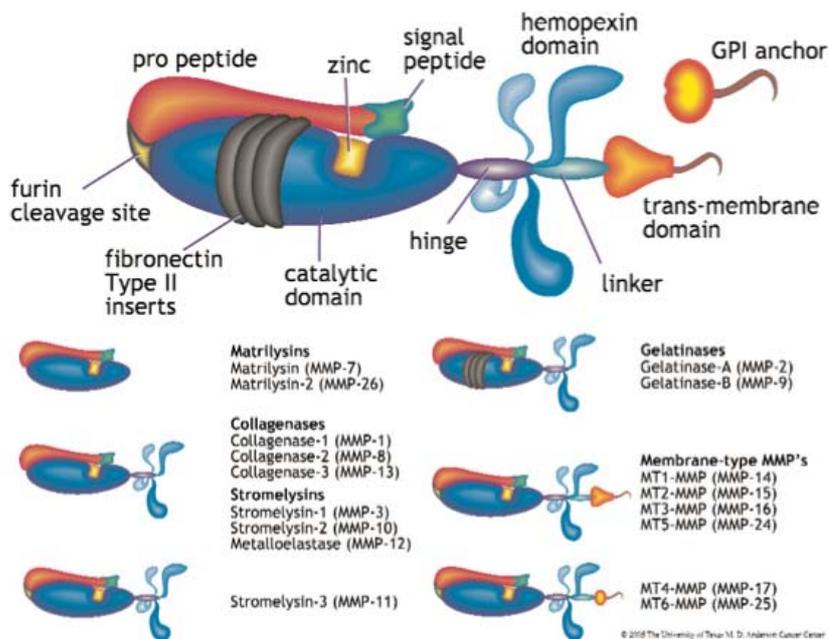
-**les stromélysines**, dont les formes -1 et -2 dégradent la fibronectine, la laminine et les protéoglycanes. La stromélysine-3 a été impliquée dans l'invasivité du cancer du sein, mais sa capacité de destruction de la MEC est assez limitée

-**les gélatinases : A** (=MMP-2) exprimée surtout par les cellules du stroma **et B** (= MMP-9) physiologiquement absente ou peu exprimée par les macrophages mais surexprimée lors de l'angiogenèse par les cellules stromales (15) . Ce sont les seules à avoir une spécificité pour le collagène IV des membranes basales.

-**les MT-MMps** (ou membrane-type matrix metalloproteinase) sont liées à la surface membranaire des cellules. Elles peuvent dégrader tous les composants de la matrice y compris les HSPG comme le perlécane mais surtout elles permettent d'agir localement à la surface cellulaire soit directement soit par l'intermédiaire de deux autres MMP secrétées, la MMP-2

et la MMP-13, qu'elles activent. Cette concentration de MMPs à la surface des cellules endothéliales est nécessaire à la migration polarisée de ces cellules.

La figure 19 et le tableau 8 résument la nomenclature utilisée pour ces différentes enzymes, leurs structures et leurs substrats principaux.



**Figure 19 : Structure des MMPs**  
(Tiré de Rhundaug et al, 2005)

Famille des métalloprotéinases humaines

Famille des Métalloprotéinases	Humaines	Substrats
<b>Collagénases</b>		
Collagénase Interstitielle	MMP-1	Collagènes de type I, II, III, VII, X (fibrillaire)
Collagénase Neutrophile	MMP-8	Collagènes de type I, II, III (fibrillaire), protéoglycan
Collagénase 3	MMP-13	Collagènes de type I, II, III, IV, gélatine, protéoglycan, fibronectine
<b>Stromélysines</b>		
Stromélysine-1	MMP-3	Collagènes de types II, IV, IX, X, XI, pro-collagène, PCP, fibronectine, laminine
Stromélysine-2	MMP-10	Collagènes de types II, IV, IX, X, XI, pro-collagène, PCP, fibronectine, laminine
Stromélysine-3	MMP-11	Serpine
<b>Gélatinases</b>		
Gélatinase A	MMP-2	Gélatine, collagène types IV, V, VII, XI, fibronectine, plasminogène
Gélatinase B	MMP-9	Gélatine, collagène types IV, V, fibronectine, élastine, plasminogène
<b>MT-MMP</b>		
MT1-MMP	MMP-14	Pro- MMP -2, pro-MMP- 13, collagènes, PCP, fibronectine, ténascine
MT2-MMP	MMP-15	Pro- MMP -2, pro-MMP- 13, collagènes, PCP, fibronectine, ténascine
MT3-MMP	MMP-16	Pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Pro-MMP-2
MT5-MMP	MMP-24	Pro-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25	Collagène,de type-IV, gélatine, fibronectine, fibrine
<b>Autres</b>		
Matrilysine	MMP-7	Collagène type IV, protéoglycan, fibronectine, élastine, gélatine, plasminogène.
Matrilysine 2	MMP-26	Fibrine
Epiilsine	MMP-28	
Métalloélastase	MMP-12	Elastine, Plasminogène

**Tableau 8 : Principales métalloprotéases matricielles humaine ( MMPs) et leur substrat.**  
(Tiré de Gabison et al, 2003)

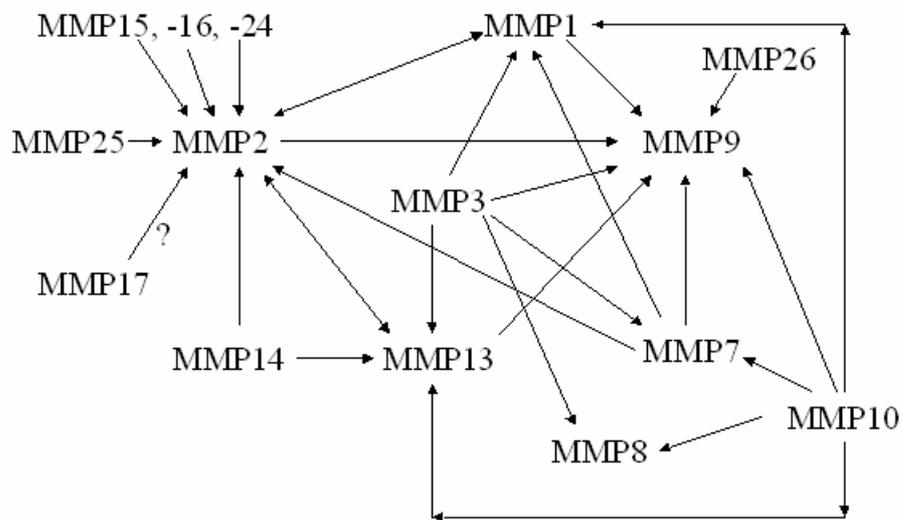
Dans le tissu normal, les MMPs sont en très faibles concentrations et leurs inhibiteurs (TIMPs) présents.

En situation d'angiogenèse active, certaines cellules de la matrice extracellulaire, essentiellement les macrophages recrutés par l'hypoxie (via VEGF-A ou PlGF) libèrent massivement les pro-MMPs qui seront activées par d'autres MMPs ou par la plasmine.

Toutes les MMPs sont impliquées dans l'angiogenèse, elles contribuent à la fois au processus pro- et anti-angiogéniques. Leur action sur la matrice extra-cellulaire peut aboutir à la libération d'un seul facteur de croissance spécifique. Par exemple, la dégradation du perlécane de la membrane basale par MMP-1 ou MMP-3 permettra la libération uniquement du b-FGF, ou encore le clivage d'un autre protéoglycane, la décorine, par les MMP- 2, -3 ou - 7 conduira à la libération de TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ).

La libération spécifique de ces facteurs de croissance permet ainsi d'agir finement sur le phénotype cellulaire des cellules environnantes. Cependant, l'activité de ces MMPs est croisée et en cascade ; aussi il est difficile de connaître leur rôle spécifique dans le processus angiogénique (figure 20).

Il est néanmoins admis à présent que les MT1-MMP (MMP-14), MMP-2, MMP-9 sont indispensables à une angiogenèse correcte.



**Figure 20 :** Cascade d'activation des MMPs.  
([http:// 6](http://6))

◇ Le système plasminogène/ uPA/uPAR/PAI-1

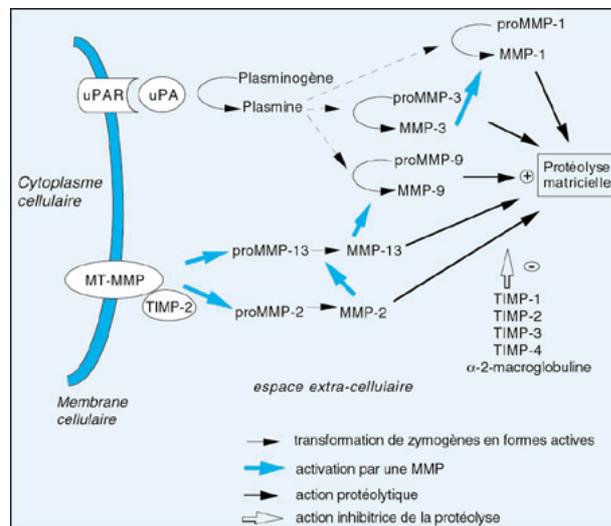
Les cellules endothéliales expriment deux protéases à sérine, activateurs du plasminogène (uPA et tPA), leur inhibiteur spécifique PAI-1 (Plasminogen-activator inhibitor-1) ainsi qu'un récepteur membranaire uPAR (63).

Le tPA (ou tissue-type plasminogen activator) est retrouvé classiquement impliqué dans la fibrinolyse plasmatique alors que l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) est retrouvé impliqué dans la protéolyse matricielle. Ces deux protéases agissent en convertissant leur substrat, le plasminogène, en plasmine.

Dans le cadre de l'angiogenèse, ce sont l'uPA et son récepteur membranaire endothélial uPAR que l'on retrouve. Surexprimé par la cellule endothéliale en réponse au VEGF-A, uPA agit comme déclencheur spécifique d'une cascade protéolytique permettant une production ponctuelle et localisée de plasmine, protéase clé dans l'activation des pro-MMPs (58) et dans la mobilisation des agents pro-angiogéniques fixés aux HSPG (79).

L'uPAR (retrouvé également au niveau de nombreux autres types cellulaires) permet, en liant l'uPA, de focaliser l'activité protéolytique de celle-ci au niveau d'un « site d'attachement focal » de la membrane endothéliale. La plasmine produite localement clive la fibrine, la fibronectine, la laminine, les protéoglycanes, le perlécane et active les pro-MMP-1, -3 et-9 qui permettent de poursuivre la protéolyse de l'ensemble des composants de la matrice extracellulaire.

Cependant, une condition *sinequanone* à ce système est l'extravasation de l'uPA et du plasminogène suite à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Un déficit en urokinase ou en plasminogène serait responsable d'ulcérations cutanées par cicatrisation imparfaite ([http:// 2](http://2)).



**Figure 21 : Systèmes plasminogène/ uPA/uPAR et MMPs impliqués dans la protéolyse matricielle.**  
(Tiré de Beaudoux et al, 2003)

#### ◇ Régulation de la protéolyse matricielle

L'activité protéolytique des deux grands systèmes MMPs et plasminogène/uPA/uPAR va être régulée à plusieurs niveaux :

-l'expression de uPa, uPAR et des MMPs se fera en réponse à différents agents pro-angiogéniques et à des cytokines

- les MMPs et uPA sont synthétisés sous formes inactives (pro-MMPs et pro-uPA). Une protéolyse par d'autres MMPs ou la plasmine est nécessaire à les activer (figure 21).

-les activités des MMPs, de la plasmine et de l'uPA sont régulées localement par leur inhibiteurs respectifs, les TIMPS solubles et les RECK membranaires (REversion-Inducing Cystein rich protein with Kazal motifs), l' $\alpha$ 2 antiplasmine et l'inhibiteur spécifique des activateurs du plasminogène (PAI-1) (figure 21). Ces inhibiteurs sont toujours synthétisés en même temps que leurs cibles (MMps et uPA) afin d'éviter une protéolyse excessive (35, 58).

#### ◆ **Rôle des macrophages**

La disponibilité des agents pro-angiogéniques et leur concentration va dépendre également des macrophages recrutés sur le site.

Le VEGF-A libéré en quantité massive et continue par les cellules hypoxiques va agir comme chimioattractant pour les monocytes. Ces cellules ont naturellement un très haut niveau d'expression du récepteur VEGFR-1 et vont ainsi être recrutées massivement dans le tissu hypoxique par interaction avec VEGF-A ou PlGF. Après différenciation en macrophages, ces derniers deviennent d'excellents promoteurs de l'angiogenèse.

Sensibles à l'hypoxie, ils deviennent eux mêmes producteurs d'agents pro-angiogéniques comme b-FGF, TNF- $\alpha$  et NO, VEGF-A, VEGF-C et diverses cytokines. NO induit une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'expression de VEGF-A par les cellules endothéliales. Par un mécanisme de feedback positif, ce VEGF-A endothélial induit en retour l'expression de la NOS endothéliale (eNOS) amplifiant ainsi l'activité pro-angiogénique du NO. Plus finement, les macrophages secrètent un petit peptide de 39 acides aminés, PR39, qui pénètre dans toutes les cellules hypoxiques, inhibe la dégradation de HIF-1 $\alpha$  et augmente ainsi leur capacité à sécréter des facteurs pro-angiogéniques. Ils produisent aussi une protéine régulée par l'oxygène, ORP150 (oxygen-regulated protein 150) qui facilite, au sein du réticulum endoplasmique la sécrétion du VEGF-A. Ainsi le macrophage est un acteur relais pour la production de facteurs pro-angiogéniques.

### **A.3.5 Réponse de la cellule endothéliale aux agents pro-angiogéniques**

Les cellules endothéliales quiescentes vont être libérées du signal anti-angiogénique qui émanait à la fois de leur contact avec la membrane basale, de leur contact avec la cellule endothéliale voisine et du récepteur Tie 2, et de la balance des agents pro- et anti-angiogéniques (112).

Le switch angiogénique « ON », c'est-à-dire pro-angiogénique, peut être due à un excès de différents facteurs pro-angiogéniques comme VEGF-A, b-FGF, a-FGF, PlGF, PDGF-BB, TGF- $\alpha$ , - $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Il-3, IL-8, Angiogénine, Proliferine, Pleiotrophine, Follistatine, Leptine, Midkine, G-CSF...

#### **A.3.5.1 Levée de l'état de quiescence**

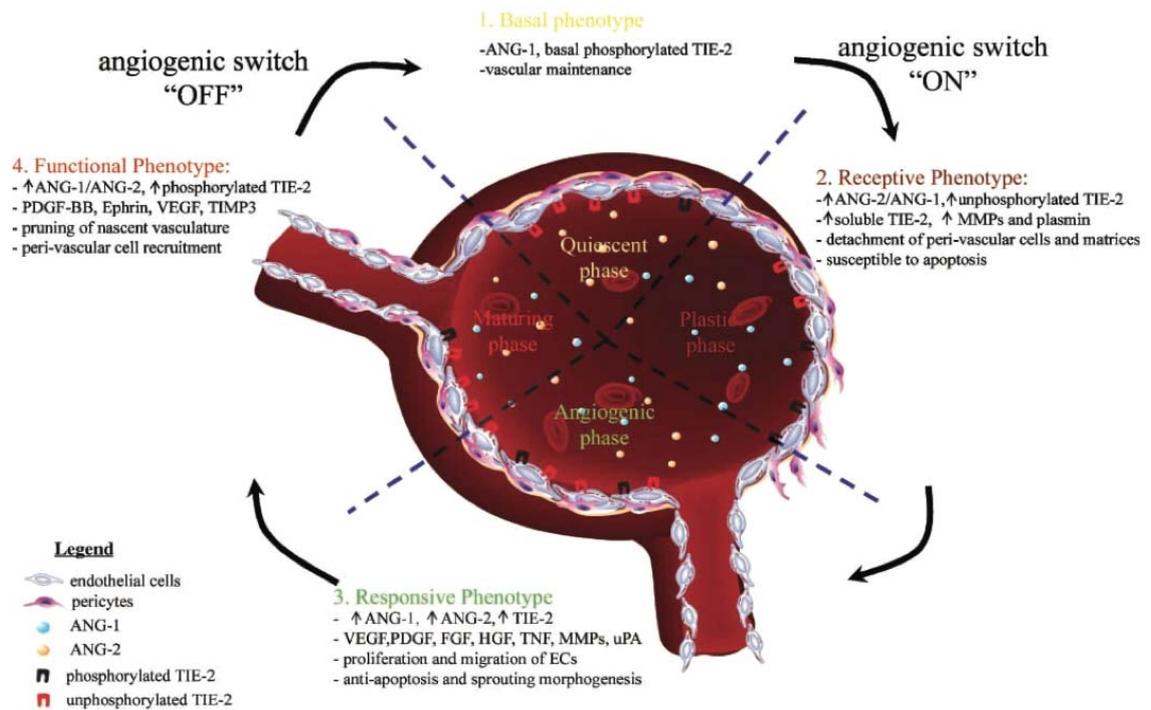
Dans le cas le plus général, VEGF-A est responsable de ce switch et de son amplification. Il induit une production accrue d'angiopoïétine 2 aux abords des récepteurs Tie-2 de la cellule endothéliale (figure 22).

Cet excès d'angiopoïétine-2 par rapport à l'angiopoïétine-1 provoque le rétrocontrôle négatif de la signalisation Ang-1/Tie-2 (absence de la phosphorylation de Tie-2) sur la cellule endothéliale quiescente avec pour conséquences principales :

- l'arrêt de production et de libération de PDGF-BB par la cellule. Le recrutement des péricytes s'arrête et les péricytes se décollent de la paroi du capillaire.
- la libération de MMP-2, de MT1-MMP pour dégrader la membrane basale,
- la déstabilisation des jonctions endothéliales (VE-cadherine et PECAM-1)

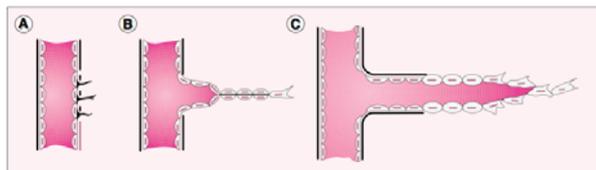
Cette déstabilisation de la paroi vasculaire s'accompagne d'une augmentation forte de la perméabilité vasculaire (perte des contacts, expression eNOS, ...)

La perte des péricytes, la dégradation de la membrane basale, la perte de contact entre les cellules endothéliales et avec la matrice, provoquent la levée de l'état de quiescence de la cellule endothéliale qui devient ainsi réceptive au VEGF-A entre autres (figure 22) (101).



**Figure 22 : Cycle angiogénique du développement vasculaire**  
(tiré de Shim et al, 2007)

Pour permettre une angiogénèse localisée et dirigée, cette levée de quiescence ne concerne que quelques cellules endothéliales qui vont être sélectionnées pour devenir des « tip cell » puis des « stalk cell » et permettre la formation de tiges néovasculaires (figure 23).



**Figure 23 : Bourgeonnement vasculaire.**  
A : sélection de « tips cells ». B : Formation de cordons néovasculaires. C : Formation de la lumière vasculaire par action des MMPs (tiré de Peppers et al, 2000)

#### A.3.5.2 Gradient de VEGF-A et Sélection des « tip cell » et des « stalk cell »

##### ◆ Gradient de VEGF-A

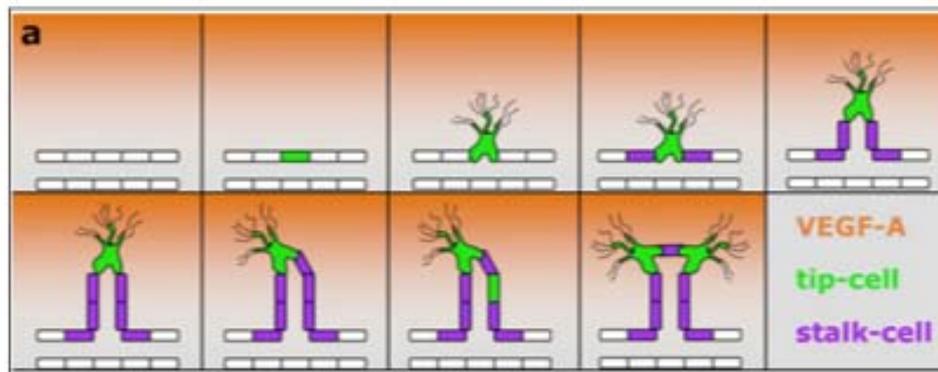
La mise en place de bourgeons localisés puis de nouveaux cordons vasculaires nécessite la présence dans la matrice extracellulaire d'un gradient de concentration décroissante du VEGF-A, entre sa source et les cellules endothéliales à activer. Ce gradient est permis par la fixation du VEGF-A à différents composants de la matrice extracellulaire et de la membrane endothéliale. Les principaux sont les protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG) matriciels

et membranaires et le cofacteur membranaire neuropiline 1 (NRP-1) situé à proximité du récepteur VEGFR.

Le gradient matriciel de VEGF-A donne à l'angiogenèse la direction spatiale à suivre.

♦ *Sélection des « tip cell » et apparition des « stalk cell ».*

La cellule endothéliale du capillaire est devenue réceptive au VEGF-A suite à la levée de son état de quiescence et va se différencier en « tip cell » en réponse à l'afflux de VEGF-A. Pour cela, elle surexprime différents récepteurs et protéines de membrane, le premier étant le VEGFR-2. L'action de VEGF-A sur ce récepteur endothélial induit une réorganisation du cytosquelette d'actine avec formation de filopodes, longues extensions polarisées très riches en VEGFR2 typiques des « tip cell » (figures 24 et 25). Le gradient de VEGF-A agit ensuite comme un signal chimioattractif via ces filopodes surexprimant VEGFR-2.

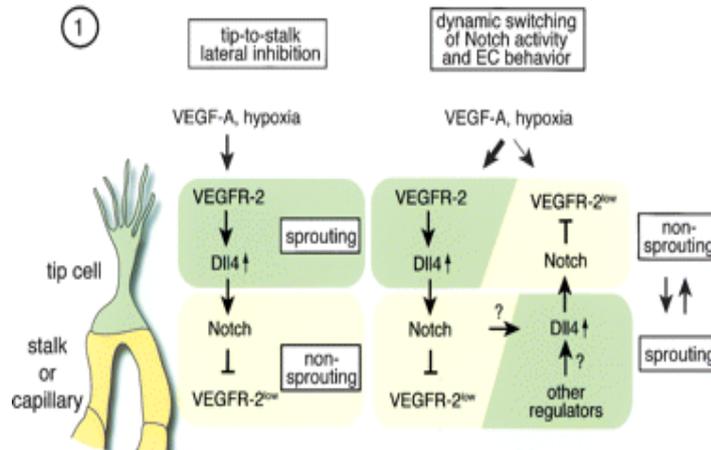


**Figure 24 : Sélection des « tip cell » et prolifération des « stalk-cell » en réponse à un gradient de VEGF-A.** Ligne du haut : sélection de la tip cell et développement d'un bourgeon vasculaire. Ligne du bas : évolution du bourgeon en tiges vasculaires avec possibilité de ramification. (tiré de Gerhardt et al, 2003)

Par bourgeon vasculaire, il n'existe qu'une seule « tip cell » initiale dans l'angiogenèse physiologique et si le gradient de VEGF-A est bien localisé, le bourgeon doit être unique. Pour rester unique, la « tip cell » impose aux cellules endothéliales sous-jacentes, via la signalisation Dll4/Notch, de se diviser mais sans expression de VEGFR-2 (figure 25), les empêchant ainsi d'acquérir le phénotype particulier de « tip cell ». Ces cellules sous-jacentes sont capables de mitose mais n'expriment pas VEGFR2 et sont appelées « stalk cell » tant qu'elles se divisent et n'acquièrent pas le phénotype de quiescence. La division des « stalk cell » permet à la « tip cell » de progresser en direction du signal d'appel.

Cependant pour progresser au sein de la matrice extracellulaire mais aussi pour conserver son phénotype de « tip cell », cette cellule doit dégrader cette matrice. A cet effet, ces filopodes expriment la métalloprotéinase membranaire MT-MMP qui active dans son micro-

environnement matricielle, la MMP-2. Cette protéolyse matricielle permet la progression de la « tip cell » et la libération régulée du VEGF-A fixé à cette matrice et nécessaire à entretenir le phénotype de « tip cell ». Elle permet également la libération de nombreux autres agents pro- ou anti-angiogéniques contenus dans cette matrice afin de permettre la mise en place précise, dirigée et contrôlée de néovaisseaux.



**Figure 25 : Signalisation VEGF-A/VEGFR-2 et Dll4/Notch dans la régulation des phénotypes « tip cell » et « stalk cell »**  
(Tiré de Roca et al, 2007)

◆ *Expression protéique des cellules endothéliales angiogéniques*

Les « tip cell » et les « stalk cell » sont des cellules endothéliales au phénotype angiogénique. En absence de régulation type Dll4/Notch ou autre, ces cellules endothéliales angiogéniques expriment ou surexpriment différentes protéines suite à leur stimulation par le VEGF-A en culture (tableau 9).

Protéines	Fonction	Récepteur du VEGF impliqué
Intégrines $\alpha 1, \alpha 2, \alpha v$	adhésion	non déterminé (n.d.)
Angiopoïétine-2	antagoniste de Tie-2	n.d.
Bcl-2	antiapoptotique	n.d.
eNOS	synthèse de NO	VEGFR-2
iNOS	synthèse de NO	n.d.
Hb-EGF	facteur de croissance	n.d.
MMP-1	collagénase interstitielle	n.d.
PAI-1	Inhibiteur de uPA et tPA	n.d.
PDGF-BB	Facteur de croissance, recrutement pericytes	n.d.
Facteur tissulaire	Inducteur de la cascade de la coagulation	VEGFR-2 et -1
VEGFR-2	Récepteur au VEGF	VEGFR-2
uPA, tPA, uPAR	Protéinases et récepteur	VEGFR-2 et -1

**Tableau 9 : Protéines connues pour être surexprimées par des cellules endothéliales cultivées en présence de VEGF.**

Le récepteur sur lequel VEGF induit cette expression ou surexpression n'est pas toujours connu (noté non déterminé : n.d.)(adapté de Petrova et al, 1999)

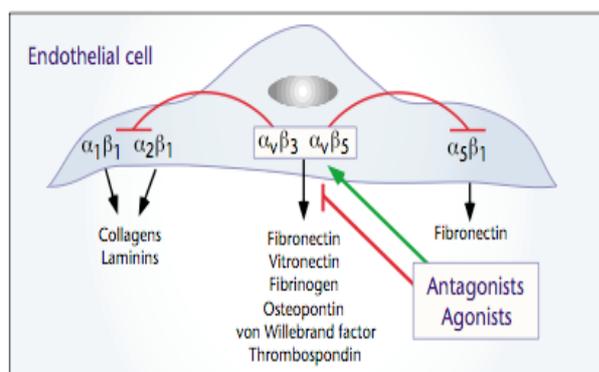
Parmi les protéines exprimées en réponse au VEGF, les intégrines et les acteurs de la protéolyse matricielle (uPA/uPAR/PAI-1 et MMPs) sont primordiaux.

◆ **Intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  et fonctions endothéliales**

Quelque soit le phénotype de la cellule endothéliale, les intégrines sont présentes et interviennent pour réguler cette cellule ( 94, 112).

◇ Interaction avec la matrice extracellulaire

La cellule endothéliale de phénotype angiogénique exprime fortement des intégrines spécifiques  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  pouvant interagir avec des composants variés de la MEC. Ainsi, l'intégrine  $\alpha\beta3$  est capable de se fixer à toutes molécules de la matrice présentant le tripeptide RGD (Arg-Gly-Asp) comme la fibronectine, la vitronectine, le fibrinogène, l'ostéopontine clivée (par action de la thrombine), la laminine ainsi que le facteur von Willebrand (73)(figures 26 et 29). Cette intégrine peut également se lier à la seule MMP constitutivement présente dans la matrice extracellulaire, la MMP-2, afin d'apporter à la cellule endothéliale une protéolyse localisée de son micro-environnement (figure 29).

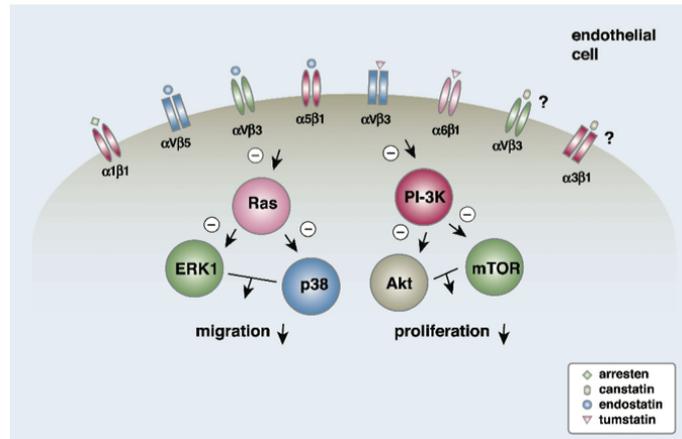


**Figure 26 : Intégrines exprimées par la cellule endothéliale angiogénique et leurs ligands matriciels.**

L'inhibition spécifique des intégrines angiogéniques  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  induit secondairement l'inhibition de l'interaction pro-angiogénique de  $\alpha5\beta1$  avec la fibronectine matricielle et de  $\alpha1\beta1$   $\alpha2\beta1$  avec le collagène ou la laminine (tiré de Hynes et al, 2002)

Cette cellule endothéliale exprime également les intégrines  $\alpha5\beta1$  et  $\alpha2\beta1$  démontrées nécessaires à l'angiogenèse en se fixant respectivement au collagène et à la fibronectine (45).

Parmi ces intégrines exprimées dans le phénotype angiogénique, nombreuses interagissent aussi avec les molécules anti-angiogéniques de la matrice comme la thrombospondine-1 (TSP-1) ou les fragments cryptiques anti-angiogéniques. C'est le cas des intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha5\beta1$  qui fixent toutes trois l'endostatine comme le montre la figure 27.



**Figure 27. Intégrines exprimées par une cellule endothéliale angiogénique et ligands divers**

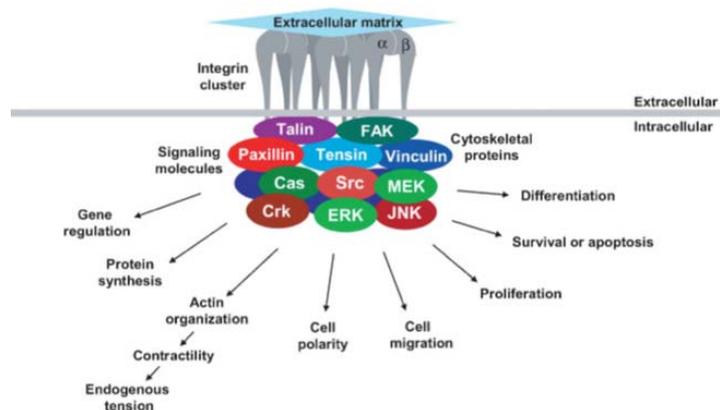
Tous les fragments cryptiques anti-angiogéniques de la MEC inhibent la prolifération et la migration cellulaires par deux voies de signalisation respectivement par la voie PI-3K et Ras mais par des intégrines très différentes (tiré de Nyberg et al, 2005).

◇ Interaction avec le VEGFR-2 de la cellule endothéliale

En plus de ces interactions avec la matrice, certaines intégrines endothéliales comme l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  peuvent interagir avec les récepteurs VEGFR-2 voisins. Ainsi elle favorise leur activité tyrosine kinase, et conjointement à son interaction avec la vitronectine induit la mitose de la cellule endothéliale.

◇ Fonctions endothéliales régulées par les intégrines

L'interaction de la cellule endothéliale avec les différents constituants de la matrice extracellulaire via les intégrines permet d'induire de nombreuses voies de signalisation qui, en coopération avec d'autres récepteurs de surface (VEGFR-2) ou d'autres intégrines, vont contrôler finement les divers processus, fonctions ou phénotypes de la cellule endothéliale comme le montre la figure 28 (8). Dans le cas de la cellule endothéliale angiogénique, la prolifération et la migration sont étroitement régulées par ce dispositif.



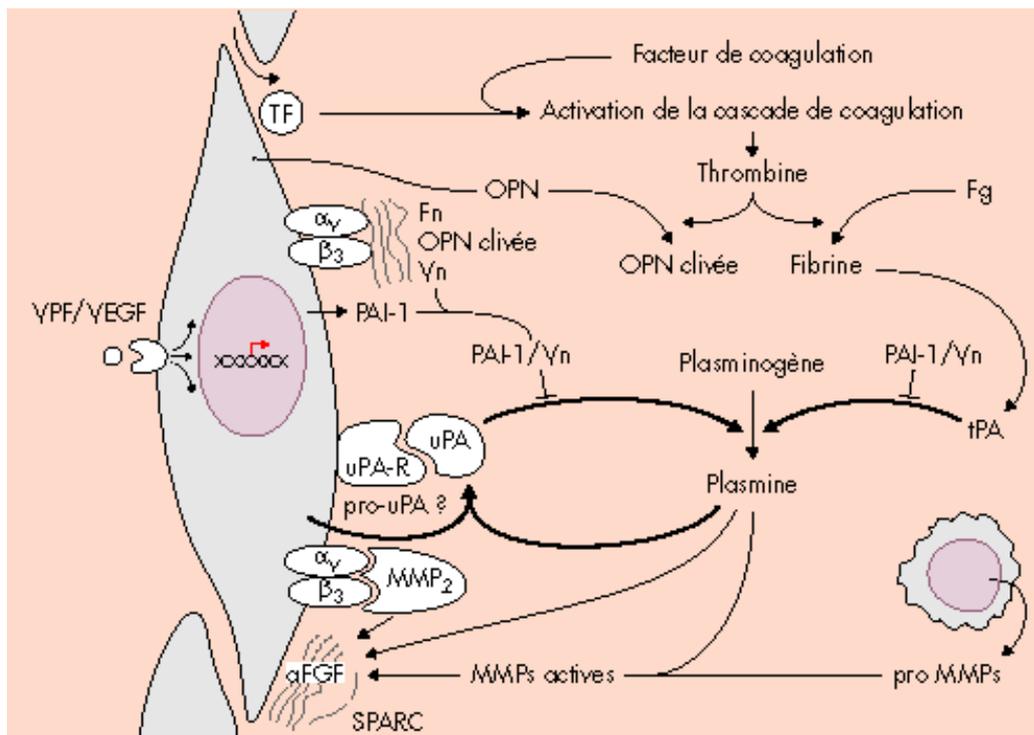
**Figure 28 : Implication des intégrines dans la plupart des voies de signalisation.**

L'interaction Cellule-matrice via les intégrines permet de réguler la plupart des fonctions, processus et phénotypes de la cellule endothéliale . (tiré de Berrier et al, 2007)

♦ *Expression des systèmes uPA/uPAR/PAI-1 et MMPs*

La cellule endothéliale stocke certaines MMPs comme les pro-MMP2, MMP9 et MT1-MMP dans des vésicules membranaires qu'elle libère ou expose sur sa membrane (MT1-MMP) lors d'une stimulation par b-FGF ou VEGF-A. Ces pro-MMPs sont ensuite activées par la plasmine.

A cet effet, la cellule endothéliale de phénotype angiogénique va surexprimer les différents acteurs du système uPA/uPAR/PAI-1. L'uPAR sera exprimé sur la membrane à l'endroit où doit avoir lieu la protéolyse matricielle. La fixation de l'uPA sur ce récepteur permettra, en présence de plasminogène provenant d'une augmentation de perméabilité vasculaire, d'obtenir une production localisée de plasmine. Ainsi, aux abords du récepteur membranaire uPAR, la plasmine activera les pro-MMPs libérées par les cellules endothéliales mais également les pro-MMPs libérées par les cellules inflammatoires recrutées lors de l'hypoxie tissulaire. La protéolyse du microenvironnement est ainsi très localisée, précise et très ponctuelle. ( 94, 112).



**Figure 29 : Expression moléculaire de la cellule endothéliale en réponse au VEGF et conséquences sur son micro-environnement.**

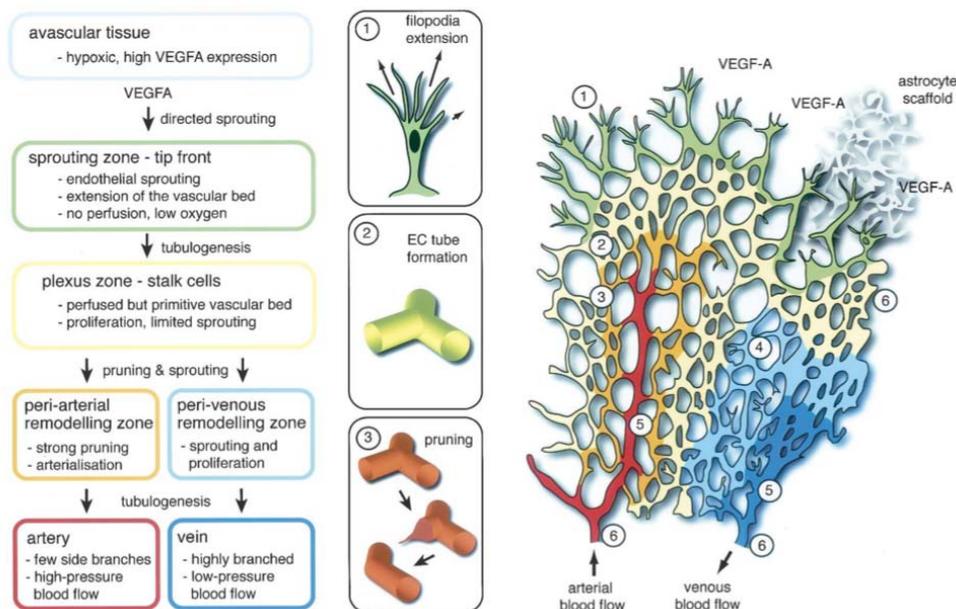
Les protéines plasmatiques sont issues d'une extravasation ou d'une hémorragie. Fg = fibrinogène ; Fn : fibronectine ; OPN : ostéopontine ; PAI-1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène ; pro-MMP : Métalloprotéase matricielle inactive ; SPARC : secreted protein acidic and rich in cystein ; TF : facteur tissulaire, uPa : activateur du plasminogène de type urokinase ; uPA-R : récepteur de uPA ; Vn vitronectine. (tiré de Vandenbunder et al,1997)

Ainsi, la réponse des cellules endothéliales aux agents pro-angiogéniques est la formation de nouveaux cordons vasculaires constitués de cellules endothéliales activées et accolées qui prolifèrent et migrent au rythme de la « tip cell » dans une matrice extracellulaire modifiée. Ce processus d'angiogenèse nécessite une étape finale de maturation ayant pour objectifs de créer une lumière au cœur des cordons vasculaires, de raccorder plusieurs cordons pour former un réseau, de supprimer les vaisseaux inutiles, d'en élargir certains et de les stabiliser ensuite en imposant l'état de quiescence aux cellules endothéliales de ce nouveau capillaire avec synthèse d'une lame basale, mise en place des jonctions intercellulaires et recrutement des cellules péri-vasculaires.

### A.3.6 Maturation des néocapillaires

#### ◆ *Maturation par zone*

La maturation des cordons vasculaires en capillaires se fait progressivement par zone. Quatre zones peuvent être repérées : zone de bourgeonnement avec les « tip cell », zone d'anastomose des bourgeonnements, zone de remodelage et zone de stabilisation (figure 30).

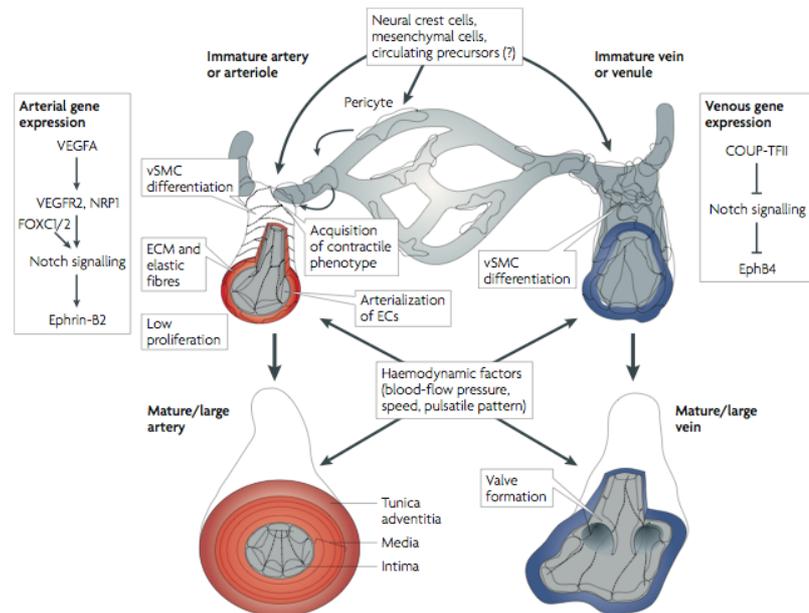


**Figure 30 : Etape de la croissance vasculaire par angiogenèse : cas de la rétine.**

1 : zone de bourgeonnement : l'extension des tips cells et de leurs filopodes favorise la croissance vasculaire le long du gradient matriciel du VEGF-A libéré par des cellules (astrocytes ici) en réponse à l'hypoxie. 2 : Zone d'anastomose des bourgeonnements pour former un réseau vasculaire non organisé en amont de la zone 1. 3 zone de remodelage artériel par taille et régression de certains vaisseaux. 4 : bourgeonnements secondaires en direction perpendiculaire à celui du gradient de VEGF-A. 5 : Différenciation en artère ou en veine des vaisseaux avec croissance circonférentielle. 6 : Stabilisation des vaisseaux par recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses. (Tiré de Roca et al, 2007)

**-Zone d'anastomose.** Cette zone est constituée de « stalk cell » et correspond au réseau capillaire issu de l'anastomose de plusieurs cordons vasculaires de cellules accolées. Ces cellules endothéliales secrètent les MMPs nécessaires à dissocier les cellules accolées afin de ménager une lumière vasculaire et donc créer un tube vasculaire, c'est la tubulogenèse. Il résulte de tout cela un réseau vasculaire très dense et complexe, perfusé mais sans organisation artérioveineuse particulière.

**-Zone de remodelage.** Coté « artériel », la régression et la « taille » de certains vaisseaux inutiles sont réalisées dans cette zone. Cela implique localement l'arrêt de prolifération et de migration des cellules endothéliales grâce à un nouvel équilibre entre les différents acteurs vus précédemment (VEGFR-2, intégrines, protéolyse...) mais également par un renversement du switch angiogénique avec baisse de la concentration en VEGF-A et angiopoïétine-2. Une disparition totale de stimulation par le VEGF entraînera la régression du vaisseau en présence d'angiopoïétine-2. La présence conjointe des deux agents pro-angiogéniques assurera le maintien du vaisseau qui se stabilisera ensuite.



**Figure 31 : Différenciation artérioveineuse des vaisseaux par la signalisation Ephrin-B2/EphB4.**  
(Tiré de Roca et al, 2007)

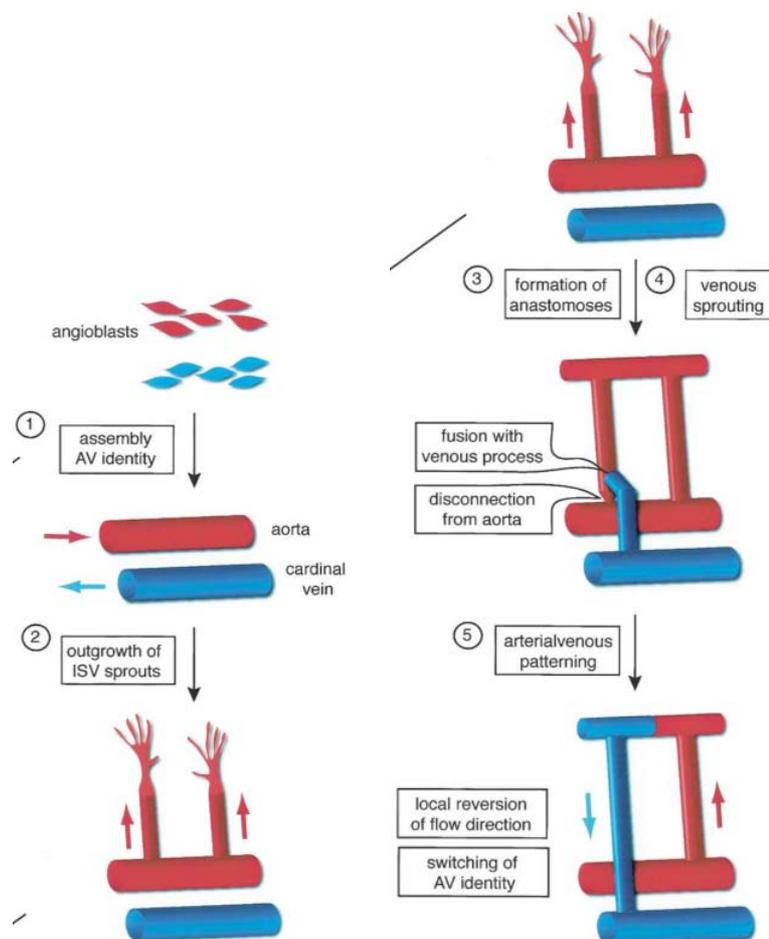
**-Zone de stabilisation.** Par réduction de l'état d'hypoxie et par expression du TGF- $\beta$ , les cellules endothéliales se stabilisent en synthétisant leur membrane basale. La signalisation Ang-1/Tie-2 induit le phénotype de quiescence avec libération de PDGF-BB et de TGF- $\beta$  permettant le recrutement des péricytes et expression des différentes molécules de jonction

(VE-Cadherin). Les capillaires acquièrent une perméabilité adéquate et le flux sanguin consolide cette maturation en confortant l'état de quiescence des cellules endothéliales.

Pour une minorité d'entre eux, la maturation comprend en plus une phase de différenciation précédant leur stabilisation. Ils continuent à évoluer, à augmenter leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi. L'interaction des cellules entre elles et le flux sanguin induisent, via la signalisation Ephrin B2/EphrB4, la spécialisation artérielle ou veineuse du vaisseau (figure 31).

#### ◆ *Hiéarchisation et sens du flux sanguin*

En vue de hiérarchiser le réseau vasculaire et d'imposer un sens de circulation au flux sanguin, un modelage se met en place, côté veineux. Des bourgeonnements secondaires se font perpendiculaires à l'axe du gradient matricielle initial de VEGF-A et en direction du réseau artériel (figure 30, n°4 et figure 32). Ce modelage veineux nécessite une signalisation Dll4/Notch fonctionnelle. Il en résulte une hiérachisation des vaisseaux et du flux sanguin.



**Figure 32 : Hiérarchisation du réseau vasculaire et sens du flux au cours de l'angiogenèse.**  
(Tiré de Roca et al, 2007)

Tous ces phénomènes de maturation sont très complexes et nécessitent de très nombreuses interactions et activation moléculaires dont l'essentiel est résumé dans le tableau 10.

Ligand/receptor (cell type)	Putative roles
VEGF/VEGFR1, 2 (EC)	Upregulates proteases for matrix organization Generates provisional matrix by increasing permeability Upregulates PDGF- $\beta$ to recruit mural cells to stabilize vessels Suppresses apoptosis to stabilize vessels Induces EC specialization (such as VVOs and fenestration)
VEGF <sub>164</sub> /VEGFR2 and NRP1 (EC)	Promotes arterial growth (?)
VEGFC/VEGFR3 and NRP2	Guides lymphatic development
EG-VEGF/PKR1, 2 (EC)	Induces EC specialization in endocrine organs (such as fenestration)
Notch pathway (EC, mural cell)	Determines fate of the common progenitor cell (EC versus mural cell?) Establishes vessel fate (artery versus vein, upstream of ephrin signaling (in zebrafish?))
EphrinB2/EphB4 (EC)	Determines arterial and venous endothelial cell specialization Guides vessel branching
PDGFB/PDGFR- $\beta$ (EC, mural cell)	Promotes proliferation, migration and recruitment of mural cells
S1P1/EDG1 (EC, mural cell)	Promotes recruitment of mural cells (downstream of PDGFB signaling?)
Ang1/Tie2 (EC)	Stabilizes vessels by facilitating interaction (EC-mural cell and EC-matrix) Suppresses apoptosis of ECs Induces hierarchical arrangement of vascular branching in the absence of mural cells
Ang2/Tie2 (EC)	Induces apoptosis of ECs in the absence of VEGF Determines lymphatic patterning
Ang1/Tie1, 2 (EC)	Coordinates vascular polarity
TGF- $\beta$ 1/TGF- $\beta$ RII (EC, mural cell)	Promotes the production of ECM and proteases Promotes differentiation of fibroblast to myofibroblast to mural cell (through serum response factor)
TGF- $\beta$ 1/ALK1 (EC)	Regulates EC proliferation and migration (activation phase)
TGF- $\beta$ 1/ALK5 (EC)	Regulates vessel maturation (resolution phase)
TGF- $\beta$ 1/ALK1 and endoglin (EC)	Promotes arterio-venous specialization (through Notch/ephrin signaling?)
Syk/SLP76 pathway	Separates lymphatic from blood vessels

Molecules (cell type)	Putative roles
VE-cadherin (EC)	Forms EC-EC junctions
N-cadherin (EC, mural cell)	Facilitates EC junctions-mural cell communication
Connexins (EC, mural cell)	Facilitates EC junctions-EC junctions and EC junctions-mural cell communications
Occludins, claudins, zona occludins (ZO1, 2, 3) (EC)	Form tight junctions in brain and retinal capillaries
CD148 (EC)	Regulates EC-mural cell interaction

Molecules (cell type)	Putative roles
$\alpha_5\beta_1$ , $\alpha_1\beta_1$ , $\alpha_2\beta_1$ , $\alpha_v\beta_3$ , $\alpha_v\beta_5$ (EC)	Suppress endothelial cell apoptosis <sup>a</sup>
Proteases (EC, mural cell)	Provide cues for vascular patterning by releasing growth factors Cleave matrix molecules (such as collagen XVIII to endostatin), plasma proteins (such as plasminogen to angiotatin) and protease molecules (such as MMP2 to PEX); cleaved products cause EC apoptosis
Protease inhibitors	Stabilize vessels by preventing dissolution of matrix

<sup>a</sup>Genetic approach does not support this role for  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  (ref. 25).

**Tableau 10 : Voies moléculaires impliquées dans la maturation des vaisseaux.**

Trois catégories de molécules participent à la maturation du réseau vasculaire et de la paroi vasculaire : tableau 1 : les voies de signalisations  
Tableau 2 : les molécules impliquées dans les interactions cellule-cellule. Tableau 3 : les molécules impliquées dans les interactions cellule-matrice. (Tiré de Jain et al, 2003)

Lorsqu'un vaisseau est maintenu dans un réseau, sa maturation lui permet de s'implanter définitivement et d'entrer dans un état de quiescence, le processus de l'angiogenèse prend alors fin.

## **B - ANGIOGENESE TUMORALE**

L'angiogenèse physiologique est un processus ponctuel, localisé faisant intervenir de très nombreux acteurs tant cellulaires que moléculaires qui imposent une régulation très complexe et subtile.

Au cours du développement cancéreux, ce processus est induit par des mécanismes similaires à ceux de l'angiogenèse physiologique.

Mais l'angiogenèse tumorale présente des particularités que nous allons décrire comme des **mécanismes d'inductions spécifiques**, une **signalisation VEGF/VEGFR** complexe, des **cancer-associated fibroblastes (CAFs)**, une batterie de **protéases pro-angiogéniques**, une **sévérité croissante du switch angiogénique**, des **cellules endothéliales au phénotype très particulier**, une **dépendance forte à certains acteurs de l'hémostase** ainsi qu'une intervention importante des **cellules souches hématopoïétiques et précurseurs endothéliaux** avec comme résultante la mise en place de **vaisseaux tumoraux particuliers**.

Avant de décrire chacune de ces particularités, nous allons rappeler ou présenter rapidement les différents acteurs et leur rôle dans l'angiogenèse tumorale en séparant les tumeurs solides des hémopathies malignes.

## **B.1 Différents acteurs angiogéniques dans les tumeurs solides**

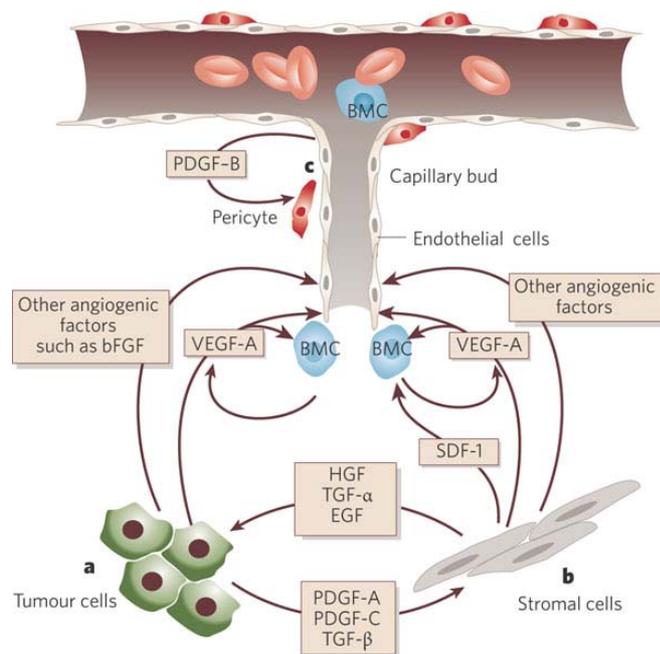
Dans le cas des tumeurs solides, l'angiogenèse fait intervenir tous les acteurs de l'angiogenèse physiologique décrits plus haut auxquels s'ajoutent des acteurs spécifiques comme les fibroblastes associés au cancer (CAFs) et les précurseurs endothéliaux circulants issus de la moelle osseuse.

La figure 33 résume l'angiogenèse dans les tumeurs solides et le rôle des principaux acteurs.

Ainsi les cellules tumorales, les cellules endothéliales, les péricytes, la matrice extracellulaire, et bien sur les facteurs de croissance pro-angiogéniques, les intégrines, les systèmes protéolytiques des MMPs et uPA/UPAR/PAI-1 participent à induire et entretenir ce processus angiogénique mais sans aucune régulation et dans un contexte souvent inflammatoire (27, 76).

Les cellules tumorales libèrent le VEGF-A et d'autres agents pro-angiogéniques comme le b-FGF, les angiopoïétines, IL-8, PlGF et VEGF-C qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales adjacentes (5). Les cellules tumorales libèrent également

des facteurs de recrutement de cellules stromales comme PDGF-A, PDGF-C ou le TGF- $\beta$  (76, 106).



**Figure 33 : Mécanismes et acteurs de l'angiogénèse dans les tumeurs solides**

a : Les cellules tumorales libèrent le VEGF-A et d'autres agents pro-angiogéniques qui stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales adjacentes. Les cellules tumorales libèrent également des facteurs de recrutement de cellules stromales comme PDGF-A, PDGF-C ou le TGF- $\beta$ . b : Les cellules du stroma constituent une source supplémentaire de facteurs pro-angiogéniques. Le recrutement des précurseurs endothéliaux circulants issus de la moelle osseuse (bone-marrow-derived angiogenic cells, BMC) est induit par SDF-1, VEGF-A et le PIGF. c, Les cellules endothéliales recrutent en libérant le PDGF-B les péricytes exprimant le PDGFR- $\beta$ . (tiré de Ferrara et al, 2005)

Les cellules du stroma tumoral constituent une population hétérogène regroupant des fibroblastes activés appelés CAFs (cancer-associated Fibroblaste), des cellules inflammatoires et des cellules immunitaires qui constituent une source supplémentaire de facteurs pro-angiogéniques. Le macrophage décrit comme très actif au cours de l'angiogénèse physiologique (cf p 43) est également très présent mais est supplémenté par les CAFs qui jouent un rôle fondamental et spécifique dans la progression tumorale au point d'être envisagé comme cible thérapeutique.

A ces nombreux types cellulaires, se rajoutent des précurseurs endothéliaux circulants issus de la moelle osseuse (CEPs ou encore bone-marrow-derived angiogenic cell, BMC). En réponse à la libération du SDF-1 (stromal-cell derived factor-1) par les CAFs, du VEGF-A et du PIGF par les cellules tumorales, ces précurseurs sont recrutés dans la tumeur.

Les cellules endothéliales quant à elles présentent un phénotype très particulier.

Les CAFs, les cellules endothéliales tumorales et les précurseurs endothéliaux feront l'objet chacun d'un chapitre séparé.

## B.1 Différents acteurs angiogéniques dans les hémopathies malignes

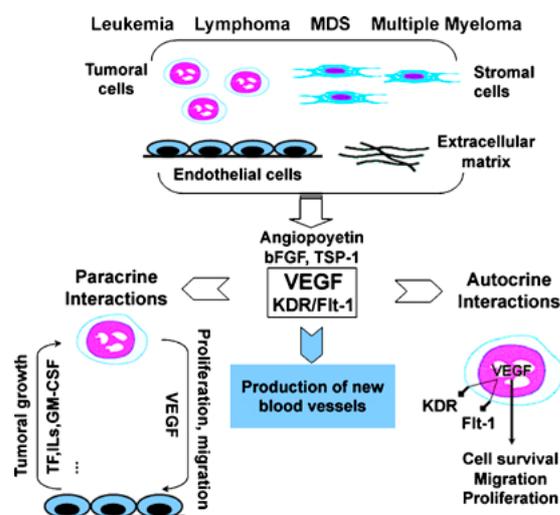
L'utilisation de la thérapie anti-angiogénique est plus récente dans le traitement des hémopathies malignes. Mais il est à présent évident que l'angiogenèse joue un rôle important dans la pathogénicité d'hémopathies telles que les leucémies aiguës (leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ou Myéloblastique (LAM)), les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH), les syndromes myélodysplasiques, les syndromes myéloprolifératifs (SMP comme la Leucémie myéloïde chronique (LMC)) ou encore le myélome multiple (MM) (55 , 60, 61, **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**, 67, 97, 98).

Ainsi la densité microcapillaire de la moelle osseuse et le nombre de précurseurs endothéliaux circulants sont décrits fortement corrélés à l'évolution de l'état de patients atteints d'hémopathies malignes.

Les acteurs de l'angiogenèse sont les cellules tumorales, les cellules du stroma, les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire qui secrètent et libèrent de nombreux facteurs pro-angiogéniques et participent à la croissance et à la progression tumorale.

Les cellules tumorales secrètent dans un mode paracrine de multiples facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines incluant les angiopoïétines, les VEGFs et b-FGF, qui vont agir à distance et stimuler l'angiogenèse. Dans ces hémopathies, une signalisation par contact direct entre la cellule endothéliale et la cellule tumorale est également présente. (60). Dans un mode autocrine, ces cellules tumorales via le VEGF induisent leur survie, leur prolifération et leur migration.

La figure 34 résume les différents acteurs angiogéniques dans les hémopathies malignes



**Figure 34 : Mécanismes et acteurs de l'angiogenèse dans les hémopathies malignes**

Les cellules tumorales, les cellules stromales, la matrice extracellulaire et les cellules endothéliales libèrent de agents pro (VEGF, b-FGF) ou anti-angiogéniques (TSP-1). Par action paracrine, ils induisent l'angiogenèse du microenvironnement médullaire ou lymphatique. Par action autocrine, les cellules tumorales inhibent via VEGFR-2 (KDR) et VEGFR-1 (Flt-1) leur apoptose, et stimulent leur prolifération et leur migration. (Tiré de Lopez-pedrerera et al, 2006)

A ces acteurs pro-angiogéniques, s'ajoutent non seulement les précurseurs endothéliaux circulants dérivés de la moelle osseuse (CEPs ou BMC) mais également le microenvironnement médullaire et le sang. (60).

Comme pour les tumeurs solides, les cellules endothéliales présentent un phénotype particulier.

## **B.2 Induction de l'angiogenèse tumorale**

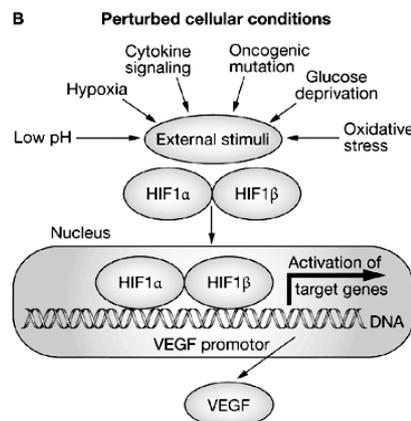
Que ce soit dans les tumeurs solides ou dans les hémopathies malignes, l'angiogenèse tumorale est induite essentiellement par surexpression d'HIF-1 $\alpha$ , soit par l'hypoxie des cellules tumorales, soit par des modifications génétiques au niveau de gènes suppresseur de tumeurs ou d'oncogènes ou encore de gènes de réparation de l'ADN.

### **B.2.1 Induction de l'angiogenèse tumorale par l'hypoxie**

Elle concerne essentiellement les tumeurs solides.

Dans un tissu avasculaire, une tumeur solide se nourrit à partir des nutriments qui diffusent à travers la matrice extracellulaire et de ce fait ne peut excéder 2-3 mm<sup>3</sup>. En se développant, la tumeur ne se suffit plus de ce type de nutrition car les cellules situées en son centre se trouvent de plus en plus isolées des nutriments et surtout de l'oxygène. L'hypoxie de ces cellules tumorales induit une accumulation d'HIF-1 $\alpha$  et la synthèse par ces cellules de nombreux facteurs pro-angiogéniques (figure 35). Dans le cas des tumeurs, ces facteurs sont essentiellement le VEGF-A, et le PlGF. Leur surexpression induit le switch angiogénique « ON » (57).

Cette situation d'hypoxie est le starter de l'angiogenèse tumorale des tumeurs solides selon le principe physiologique de l'hypoxie décrit au chapitre A.3.3.3.



**Figure 35 : Surexpression de HIF-1 $\alpha$  dans différentes conditions pathologiques dont le cancer.**  
Tiré de Gasparini et al, 2005)

Cependant, l'hypoxie n'est pas le seul critère d'induction de l'angiogenèse tumorale, les modifications génétiques subies par la cellule tumorale sont également responsables.

## **B.2.2 Induction de l'angiogenèse par des modifications génétiques**

Les modifications que peuvent subir certains gènes dans les cellules aboutissent à la création de clone de cellules tumorales pour lesquelles l'apoptose et les capacités de différenciation sont fortement diminuées et pour lesquelles la prolifération est stimulée.

### **B.2.2.1 Tumeurs solides**

Lorsque ces mutations concernent des gènes suppresseurs de tumeurs comme *P53* et *Von Hippel Lindau* ou des oncogènes comme *ras*, *c-myc*, *HER-2* ou *EGFR* (tableau 11) par exemple, elles induisent la production accrue d'agents pro-angiogéniques tels que le VEGF-A par les cellules tumorales et/ou un rétro-contrôle négatif sur la production d'agents anti-angiogéniques comme la TSP-1 (21, 77, 85). Ces modifications génétiques agissent essentiellement par surexpression d'HIF-1 $\alpha$  dans la cellule tumorale (31).

Oncogene <sup>b</sup>	Implicated pro-angiogenic activity
<i>K-ras</i> , <i>H-ras</i>	VEGF upregulation, TSP-1 downregulation
<i>v-src</i>	VEGF upregulation, TSP-1 downregulation
<i>c-myb</i>	TSP-2 downregulation
<i>N-myc</i>	angiogenic properties in neuroblastoma
<i>c-myc</i>	angiogenic properties in epidermis
<i>HER-2</i>	VEGF upregulation
<i>EGFR</i>	VEGF, bFGF, IL-8 upregulation
<i>PyMT</i>	TSP-1 downregulation
<i>c-fos</i>	VEGF expression
<i>trkB</i>	VEGF downregulation
<i>HPV-16</i>	secretion of VEGF and IFN- $\alpha$
<i>v-p3k</i>	VEGF production and angiogenesis
<i>ODC</i>	novel angiogenic factor
<i>PTTG1</i>	VEGF and bFGF upregulation
<i>E2a-Pbx1</i>	induction of mouse angiogenin-3

**Tableau 11 : Impact de différents oncogènes sur l'angiogenèse tumorale dans les tumeurs solides.**  
(tiré de Rak et al, 2000)

Factor <sup>a</sup>	Bioactivity	Angioactivity	Impact of ras
VEGF	growth factor	stimulator	upregulation
bFGF	growth factor	stimulator	upregulation
TGF- $\alpha$	growth factor	stimulator	upregulation
TGF- $\beta$	growth factor	stimulator	upregulation
TNF- $\alpha$	cytokine	stimulator (at low conc.)	upregulation
G-CSF	cytokine	stimulator	upregulation
IGF-1	growth factor	stimulator	upregulation
PDGF	growth factor	stimulator	upregulation
OPN	ECM component	stimulator	upregulation
TSP-1	ECM component	inhibitor	downregulation
TIMP	MMP inhibitor	inhibitor	downregulation
PGE	prostaglandin	stimulator	upregulation

**Tableau 12 : Impact de l'activité de l'oncogène *ras* sur l'expression d'agents pro et anti-angiogéniques.**  
(tiré de Rak et al, 2000)

Le tableau 12 montre la complexité du processus angiogénique induit par l'oncogène *ras* puisqu'il effectue un rétrocontrôle positif sur la plupart des agents pro-angiogéniques et un

rétrocontrôle négatif sur les inhibiteurs de l'angiogénèse. Lorsque l'oncogène *ras* est muté, il devient hyperactif dans la cellule.

### **B.2.2.2 Hémopathies malignes**

Dans le cas des hémopathies malignes, l'hypoxie n'est pas le mécanisme inducteur. Les modifications génétiques des cellules au niveau d'oncogène (comme *abl* par exemple) seraient essentiellement mises en cause avec pour conséquences une surproduction de VEGF-A pour l'angiogénèse vasculaire et de VEGF-C pour la lymphangiogénèse (60).

## **B.3 Switch angiogénique tumoral et signalisation VEGF/VEGFR**

Le switch angiogénique induit par l'hypoxie ou par les modifications génétiques des cellules cancéreuses est rapidement aggravé par l'intervention non régulée de tous les acteurs de l'angiogénèse physiologique déjà décrits et ce dans un contexte souvent inflammatoire (56, 57, 86, 92). A cela s'ajoute l'intervention des autres types cellulaires comme les précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse (CEPs ou BMC).

Parmi tous les agents pro-angiogéniques impliqués dans l'angiogénèse tumorale, le VEGF s'avère le plus important car massivement sécrété par la cellule tumorale et les nombreux types cellulaires qui l'accompagnent.

### **B.3.1 Tumeurs solides**

Le VEGF a été détecté à des concentrations très élevées dans un certain nombre de tumeurs solides (10, 99, 100).

Le tableau 13 montre une étude réalisée par Presta et col (79) cherchant à établir une corrélation entre les niveaux de b-FGF ou de VEGF avec la densité vasculaire maligne (MDV) et l'état clinique du patient. Ainsi, à de rares exceptions près, il existe pour la plupart des tumeurs solides examinées une corrélation entre le taux de VEGF intra-tumoral et la densité vasculaire maligne. Cette corrélation n'est pas systématique avec b-FGF.

Tumor type	FGF2 levels vs. MVD	FGF2 levels vs. clinical outcome <sup>a</sup>	VEGF levels vs. MVD
Astrocytoma	+ -	N.D.	++
Basal cell carcinoma	-	-	+
Bladder carcinoma	+	++	+
Breast carcinoma	+ - - - -	+++	+++
Cardiac myxoma	+	N.D.	N.D.
Colorectal adenocarcinoma	-	--	+++
Epidermoid lung carcinoma	-	+	+
Gastric carcinoma	-	-	+
Glioma	++ -	+ - -	++
Hepatocellular carcinoma	-	++	+
Laryngeal adenocarcinoma	-	-	+
Leiomyoma	-	N.D.	+
Leiomyosarcoma	-	N.D.	+
Melanoma	+++	++	N.D.
Meningioma	--	-- -	-
Mesotelioma	+	+	+
Non-Hodgkin's lymphoma	-	+	N.D.
Non-small cell lung carcinoma	-	+	N.D.
Pancreatic adenocarcinoma	++ -	++ -	+++
Parathyroid adenoma	+	-	N.D.
Pituitary adenoma	+	N.D.	+
Prostatic adenocarcinoma	++ -	+	+++
Pulmonary adenocarcinoma	+	N.D.	+
Renal carcinoma	--	+ -	-
Squamous cell carcinoma	+++ -	+ - - -	+++
Thymoma	-	-	N.D.

**Tableau 13 : Corrélation entre la concentration trouvée en b-FGF (FGF-2) ou VEGF et la densité vasculaire maligne (MDV) ou l'état clinique du patient dans différentes pathologies cancéreuses.**

<sup>a</sup>L'état clinique est apprécié selon le grade de la tumeur, le statut métastatique, les rechutes, et le mauvais pronostic. + : corrélation positive, - pas e corrélation, N.D. : non déterminé. (Tiré de Presta et al, 2005).

Mais dans la tumeur, toutes les cellules tumorales n'expriment pas le VEGF. En ce qui concerne les tumeurs présentant une nécrose significative, l'expression du VEGF est particulièrement élevée dans les cellules tumorales adjacentes aux zones de nécrose et exposées à l'hypoxie. HIF-1 $\alpha$  y induit la transcription du gène codant pour le VEGF.

Les cellules endothéliales adjacentes à ces cellules tumorales, quant à elles, n'expriment pas le VEGF mais expriment à leur surface les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. L'angiogenèse tumorale est donc induite comme l'angiogenèse physiologique selon un mode paracrine.

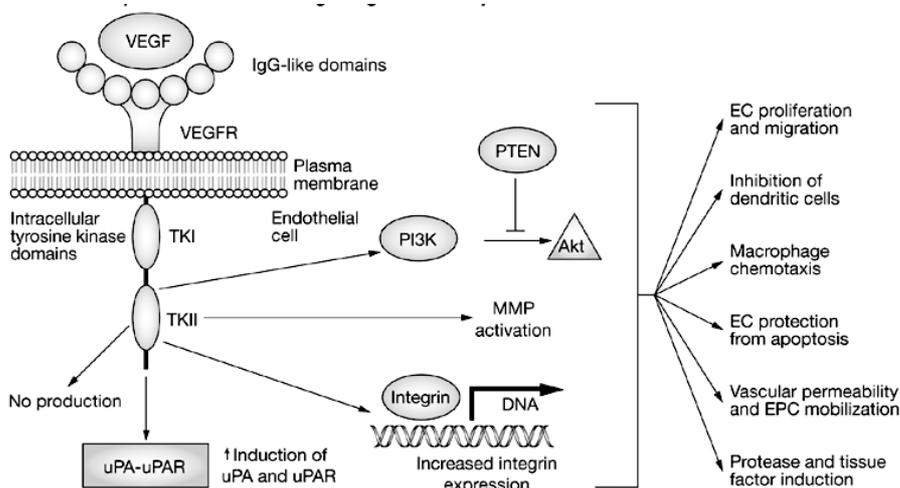
La signalisation VEGF-A/ VEGFRs induite par les cellules tumorales est accompagnée  
-d'une activation des cellules endothéliales avec les nombreuses conséquences biologiques décrites pour l'angiogenèse physiologique et résumées dans la figure 36,

-d'une augmentation significative de la densité de microvaisseaux dans les tumeurs qui est positivement corrélée avec le pouvoir métastatique de celles-ci et l'évolution du tableau clinique,

- d'une inflammation pro-angiogénique par attraction chimiotactique des monocytes et macrophages naturellement dotés du récepteur VEGFR-1 puis des lymphocytes par différentes cytokines (IL-1 et IL-6). Ces cellules inflammatoires constituent une source supplémentaire de VEGF et de cytokines pro-angiogéniques.

L'angiogenèse mais également la lymphangiogenèse sont stimulées dans la tumeur par sécrétion respectivement de VEGF-A et de VEGFC ainsi que diverses cytokines.

Les vaisseaux tumoraux obtenus possèdent des caractéristiques prolifératives et morphologiques types qui requièrent une stimulation constante par le VEGF-A



**Figure 36 : Activité biologiques résultant de la signalisation VEGF/VEGFR. .**  
(tiré de Gasparini et al, 2005)

Dans les tumeurs solides, le **PIGF** est également surexprimé (100). Il se fixe uniquement sur le VEGFR-1 et comme pour le VEGF-A, PIGF agit comme chimioattractant pour les macrophages au fort potentiel pro-angiogénique.

### **B.3.2 Hémopathies malignes**

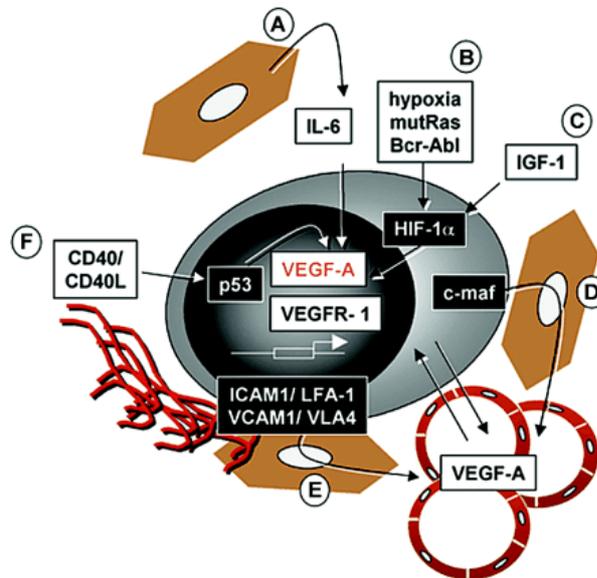
Dans le cas des hémopathies malignes, le VEGF est surexprimé par les cellules tumorales et mais également par les cellules stromales (60) et les cellules endothéliales et est impliqué dans de nombreux mécanismes (51).

L'expression du VEGF par les cellules tumorales dans les hémopathies malignes en général est régulée par de très nombreux mécanismes comme (figure 37) :

- la surexpression d'HIF-1 $\alpha$  suite à des modifications génétiques (*ras muté, bcr-abl*) ou une hypoxie
- la sécrétion d'IL-6 ou de VEGF par les cellules stromales de la moelle osseuse ou les cellules tumorales (mode paracrine ou boucle autocrine).
- l'action d'IGF-1 (Insulin-growth factor) qui induit l'expression de VEGFR-1 et la sécrétion de VEGF
- l'expression des intégrines tumorales  $\beta$ 7

- l'expression par les cellules tumorales de molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) nécessaires à leur adhésion à la matrice extracellulaire et aux cellules stromales médullaires et régulant positivement la production de VEGF et sa sécrétion.

- ou encore par l'activation du CD40 induisant la sécrétion du VEGF dépendant du gène *p53*.



**Figure 37 Régulation de l'expression du VEGF dans les hémopathies malignes en général.**

A : par la sécrétion d'IL-6 ou de VEGF par les cellules stromales de la moelle osseuse ou les cellules tumorales (paracrine ou boucle autocrine). B et C surexpression de HIF-1α par l'hypoxie, des mutant d'oncogènes (Bcr-Abl). Ou encore par IGF-1 ce qui induit la surexpression de VEGFR-1. D : par l'expression de l'intégrine tumorale β7 sous la direction de c-maf. E : par l'expression tumorale de molécules nécessaire à l'adhésion des cellules tumorales à la matrice extracellulaire et aux cellules stromales de la moelle osseuse. F : par l'activation de CD40 induisant la sécrétion P53-dépendante du VEGF (d'après Podar et al, 2005)

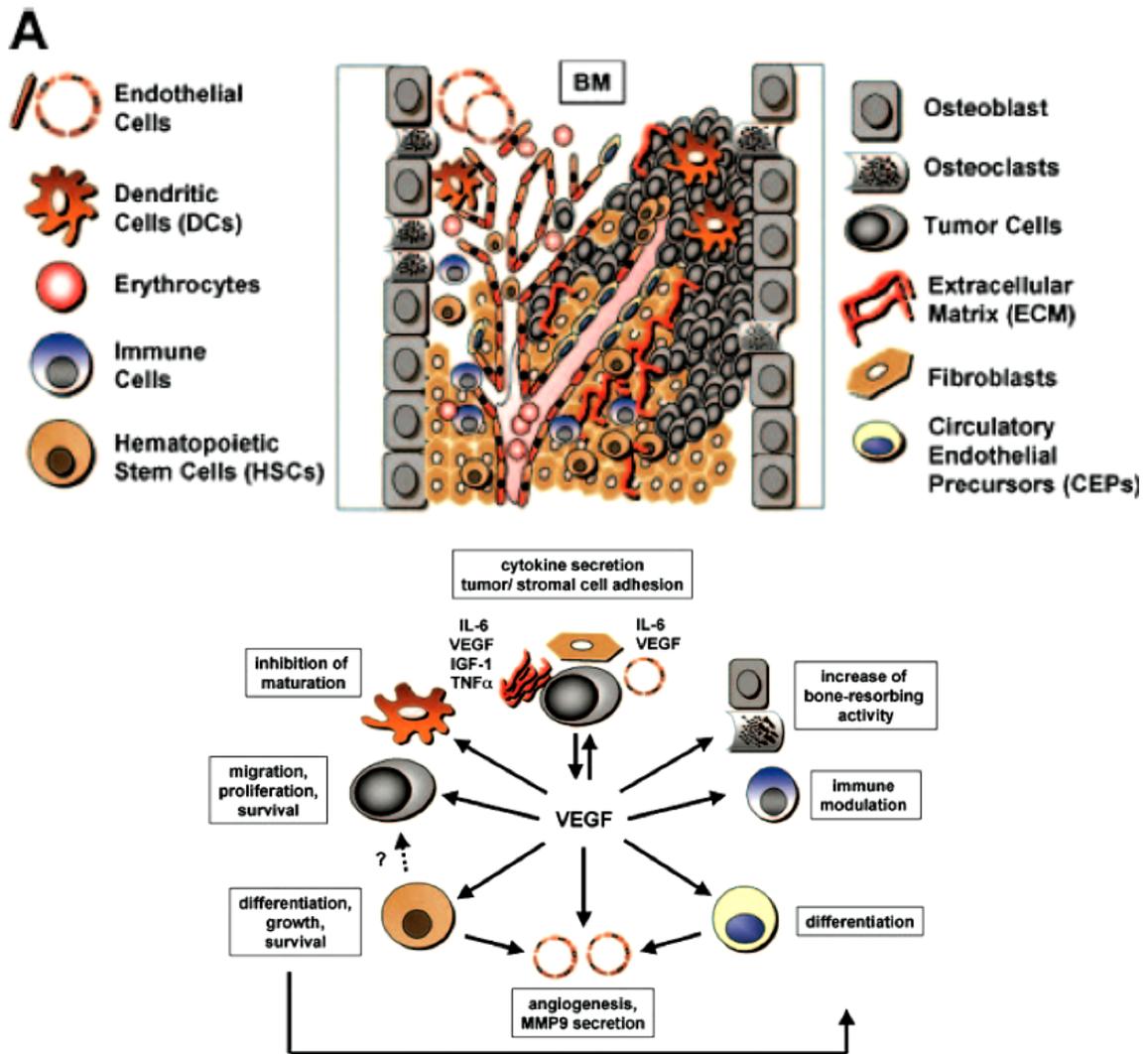
Dans le microenvironnement médullaire, le VEGF va avoir de nombreuses fonctions comme le résume la figure 38 (55, 77, 87)

La signalisation VEGF/VEGFR intervient dans :

-l'activation autocrine des cellules tumorales. Le système complet VEGF-A/VEGFR-2 (KDR) a été retrouvé exprimé par de nombreuses lignées cellulaires.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) normales n'expriment pas le récepteur VEGFR-2 alors que ces cellules blastiques leucémiques l'expriment. La sécrétion de VEGF par ces blastes est alors responsable de la progression de la maladie en régulant positivement selon le mode autocrine leur prolifération et négativement leur apoptose.

-l'activation paracrine des cellules stromales pour induire l'angiogenèse au sein de la moelle osseuse. Les hémangioblastes exprimant naturellement le VEGFR-2 (+) et précurseurs à la fois des cellules souches hématopoïétiques (VEGFR-2-) et des précurseurs endothéliaux (VEGFR-2+) seraient également impliqués mais pas les cellules endothéliales circulantes (55, 77).



**Figure 38 : Fonctions physiopathologiques du VEGF dans le microenvironnement médullaire.**

A : Composants du microenvironnement médullaire et acteurs de l'angiogenèse tumorale. Les diverses cellules sont en étroite association avec les composants de la matrice extracellulaire. B : Parallèlement à la stimulation de l'angiogenèse, le VEGF régule les cellules souches hématopoïétiques et donc l'hématopoïèse (tiré de Podar et al, 2005)

L'expression de ce système VEGF-A/VEGFR2 a été retrouvée fortement corrélée à la densité vasculaire dans les biopsies médullaires de patients atteints de Leucémie aigüe myéloblastique (LAM). Il a en effet été reporté une augmentation de la densité microcapillaire au sein de la moelle osseuse de ces patients et un état de rémission complète associé à la restauration du réseau capillaire normal par chimiothérapie (77, 97, 98)

Le VEGF a été identifié comme un facteur de risque pronostique indépendant.

En dehors de cette régulation autocrine des cellules tumorales et paracrine de l'angiogenèse, le VEGF intervient dans

- la régulation positive des cellules souches hématopoïétiques et donc dans l'hématopoïèse
- la modulation de la réponse immunitaire en améliorant l'adhésion des cellules cytotoxiques NK (Natural Killer) à l'endothélium tumoral.

- le recrutement des monocytes et des précurseurs endothéliaux circulants
- l'induction de la différenciation de ces derniers (77).

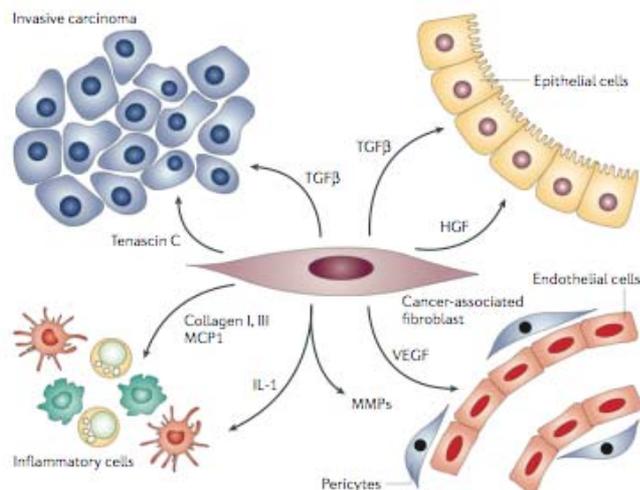
Par ailleurs, la lymphangiogenèse est également concernée puisque le système VEGF-C /VEGFR3 serait responsable de la prolifération et de la survie des cellules leucémiques ainsi que de la résistance à la chimiothérapie (52, 59).

Comme nous l'avons montré dans le cas de l'angiogenèse physiologique dans la moelle osseuse, l'angiopoïétine-2 associée à cette signalisation VEGF/VEGFR est fortement impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales et a été identifiée comme un facteur pronostique indépendant de la survie globale des patients atteints de LAM (97, 98).

L'angiogenèse est cruciale dans le développement des hémopathies malignes et fortement dépendante de la signalisation VEGF/VEGFR.

#### **B.4 Cancer-associated Fibroblastes (CAFs)**

L'angiogenèse tumorale se caractérise également par la présence d'une population cellulaire particulièrement active dans le stroma tumoral. Ce sont des fibroblastes activés, associés aux tumeurs qui jouent un rôle fondamental au point d'être considéré comme des cibles thérapeutiques potentielles.



**Figure 39 : Fonctions du fibroblaste activé (CAF) dans le stroma tumoral d'une tumeur solide**

MCP-1 : monocytes chemotactic protein 1 ; IL-1 : interleukine 1 ; HGF : hepatocytes growth factor ; TGF- $\beta$  : transforming growth factor. (Tiré de Kalluri et al, 2006)

Mis au service de la tumeur par les nombreux facteurs (PDGF-A et -C et TGF- $\beta$ ) que cette dernière secrète, ces CAFs stimulent sans cesse l'angiogenèse et le développement tumoral

par leurs multiples interactions et par les facteurs de croissance, les cytokines et la matrice extracellulaire qu'ils synthétisent (figure 39).

Les CAFs stimulent la prolifération des cellules cancéreuses en libérant le TGF- $\beta$  et entretiennent une réponse inflammatoire en recrutant les cellules de l'inflammation (macrophages (MCP1) et polynucléaires neutrophiles (IL-1)). Ils favorisent la progression tumorale en sécrétant du collagène I et III et de la tenascine C et stimulent l'angiogenèse par le VEGF et les multiples MMPs qu'ils libèrent et par interaction avec les péricytes. Par ailleurs, il a été décrit la production, par ces CAFs, de facteurs de croissance et de survie utiles à la cellule tumorale comme l'EGF (Epidermal growth factor), l'HGF (Hepatocyte growth factor) ou encore l'Hereguline (49).

Les fibroblastes activés sont retrouvés dans les tumeurs solides et dans le microenvironnement médullaire dans le cas des hémopathies malignes.

### **B.5 Rôle pro-angiogénique des protéases dans les tumeurs**

Comme dans l'angiogenèse physiologique (cf p39), les protéases sont très impliquées dans l'angiogenèse tumorale.

**Les MMps.** Les tumeurs surexpriment essentiellement les MMP-1, -2, -3, -7, -9, -16 et MT1-MMP et leur niveau d'expression est corrélé aux capacités invasive et métastatique des tumeurs et au risque de rechute (94).

Les MMPS sont surexprimées par les cellules tumorales mais surtout par les fibroblastes activés (CAFs) et par les cellules inflammatoires comme les macrophages en réponse aux cytokines et aux facteurs de croissances libérés par les cellules tumorales.

Les MMP-2 et MMP-9 ont été démontrées indispensables pour la mise en place du switch angiogénique (94). En effet, la MMP-9 est capable de libérer le VEGF-A fixé à la matrice extracellulaire. Son expression est fortement augmentée dans les macrophages et les cellules stromales en réponse au VEGF-A tumoral. Son action libère ou empêche le VEGF-A de se fixer à la matrice extracellulaire créant ainsi un switch angiogénique sévère et ne permettant pas la mise en place d'un gradient de VEGF-A entre les cellules tumorales et le capillaire cible. La MMP-9 est impliquée plutôt dans la vasculogenèse tumorale que dans l'angiogenèse (2).

Par ailleurs, fixée à la surface des cellules tumorales via le récepteur à l'acide hyaluronique (le CD 44), la MMP-9 faciliterait l'invasion tumorale sanguine (2, 100).

Comme dans l'angiogenèse physiologique, les MMPs agissent de concert avec les agents pro-angiogéniques et avec le système uPA/uPAR/PAI-1.

Le système uPA/uPAR/PAI-1 déjà très présent dans l'angiogenèse physiologique (cf p 42) est particulièrement actif ici dans le stroma tumoral du fait d'une perméabilité vasculaire exagérée au niveau des vaisseaux tumoraux avec extravasation importantes des protéines plasmatiques comme le plasminogène. Il amplifie et conforte ainsi l'activité protéasique pro-angiogénique des MMPs.

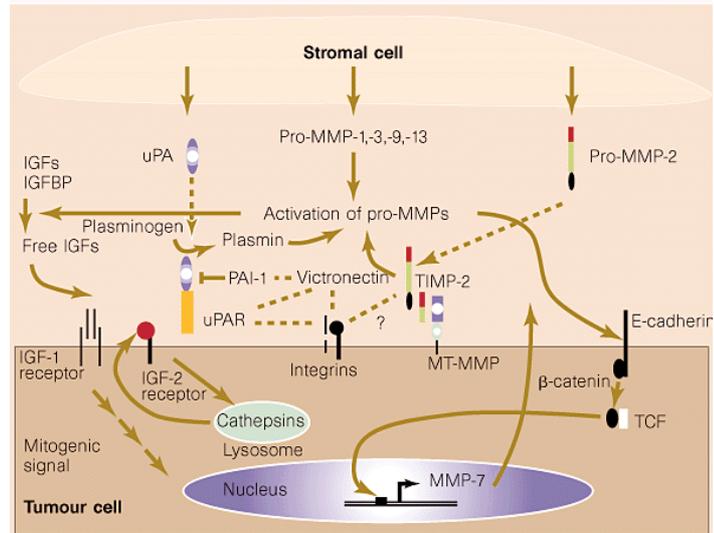


Figure 40 : Rôles des deux systèmes protéasiques MMPs et uPA/uPAR/PAI-1 impliqués dans la tumorigénèse. (tiré de Edwards et al, 1998)

### B.6 Sévérité croissante du switch angiogénique

Au fur et à mesure de la progression tumorale, le switch angiogénique en faveur d'une activité pro-angiogénique s'amplifie par le fait que la tumeur solide, en se développant, libère sans cesse de nouveaux agents pro-angiogéniques comme le montre la figure 41.

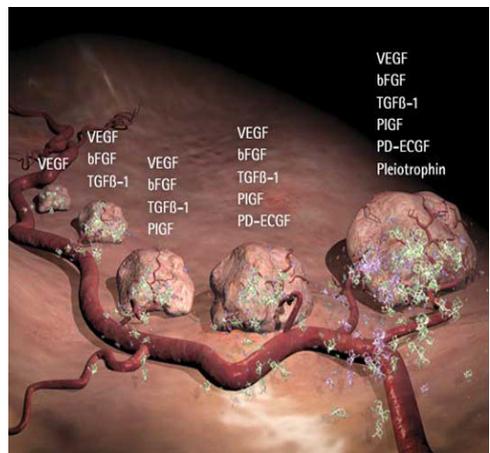


Figure 41 : Diversité croissante des facteurs pro-angiogéniques et accumulation au cours du développement d'une tumeur solide.

## **B.7 Phénotype tumoral des cellules endothéliales : phénotype aberrant**

Quelque soit le type de tumeur, l'angiogenèse résulte d'un switch angiogénique ; cependant, celui-ci est décalé à l'extrême avec une surabondance de facteurs pro-angiogéniques et un déficit de facteurs anti-angiogéniques. Parallèlement à cela, l'abondance des systèmes protéasiques ne permet pas la régulation de l'angiogenèse ni même la création aux abords de la cellule endothéliale du gradient de VEGF-A dont elle a besoin.

Par conséquent, la cellule endothéliale se retrouve confrontée à une sortie de quiescence totalement anarchique avec un emballement de ses voies d'expression sans logique et sans orchestration temporelle ni même spatiale. Par la suite, jamais ces cellules ne peuvent réacquérir un état de quiescence. Elles gardent toujours un phénotype angiogénique qui, dans le cas des cancers, est aberrant.

Ce phénotype angiogénique est typiquement tumoral, mais peut très certainement différer d'un cancer à un autre et d'un moment à un autre.

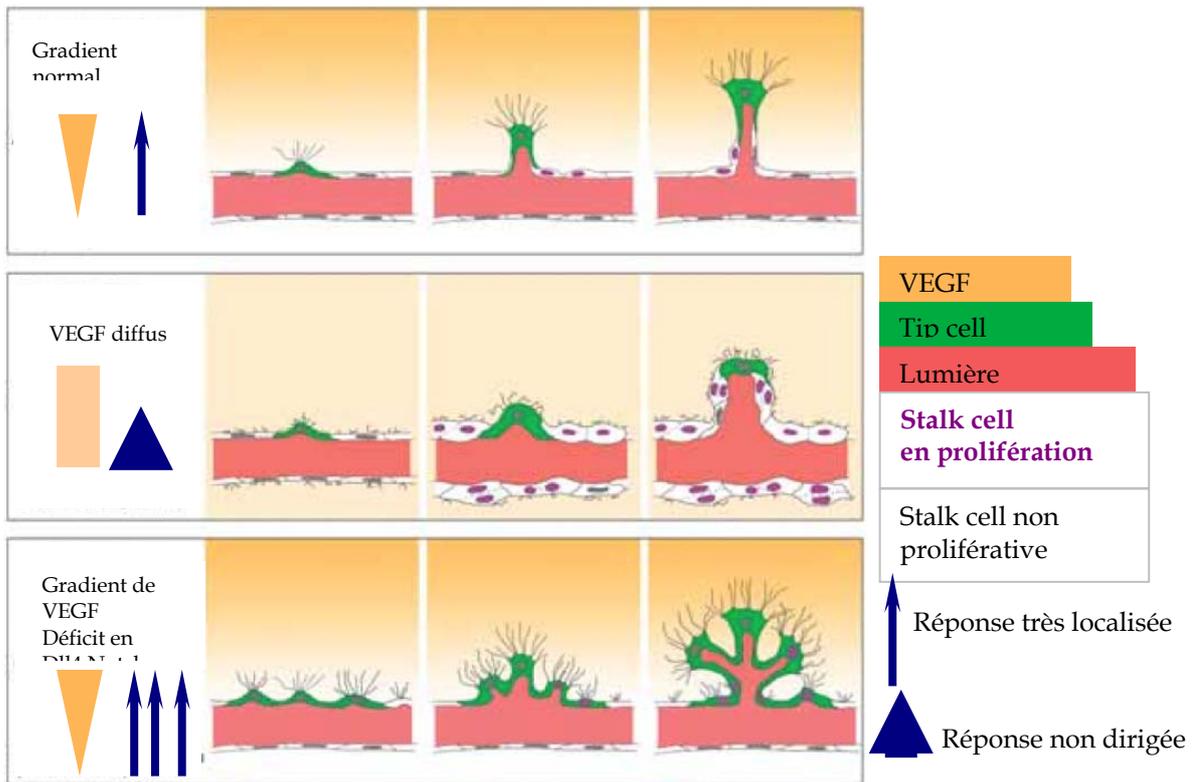
Cependant les études actuelles sur ce phénotype particulier permettent de faire ressortir quelques points communs concernant la réponse de la cellule endothéliale à une production massive de VEGF-A sans possibilité de gradient matriciel.

### **B.7.1 Sélection des « tip-cell » et « stalk cell »**

Lors de sa sortie de quiescence par le switch angiogénique tumoral, la cellule endothéliale va s'activer et prendre le phénotype de « tip cell » comme dans l'angiogenèse physiologique (cf chapitre A.3.5.2) tout d'abord en surexprimant les récepteurs VEGFR-2.

Cependant dans le tissu cancéreux, non seulement il n'existe pas de gradient de VEGF-A destiné à ne sélectionner que certaines cellules, mais les cellules endothéliales présentent un déficit en récepteur Notch (38). Dans l'angiogenèse physiologique, la signalisation Dll4/Notch et le gradient VEGF-A permettait d'empêcher l'expression du VEGFR-2 dans ces cellules sous-jacentes au « tip cell » afin de limiter le nombre de bourgeonnements et favoriser la progression d'un seul (figure 42).

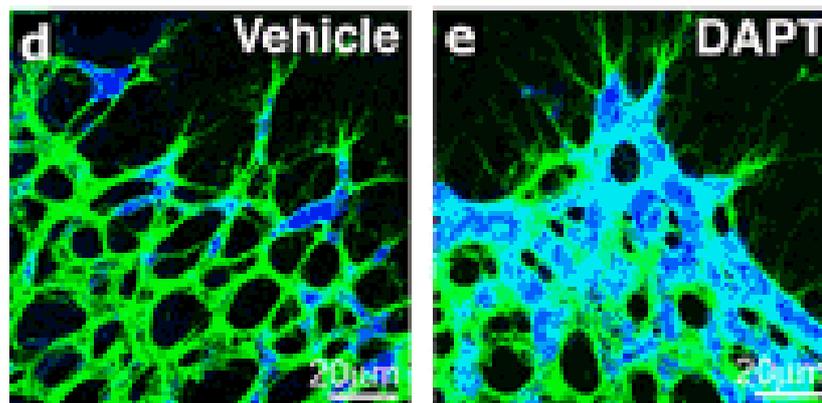
Dans l'angiogenèse tumorale, cette absence de gradient de VEGF-A et de signalisation efficace Dll4/Notch induit une sélection large des « tip cell » et l'absence de régulation des cellules sous-jacentes. Les « stalk cell » de l'angiogenèse physiologique n'existent pas.



**Figure 42 : Bourgeonnement capillaire selon le gradient en VEGF-A et la signalisation Dll4/Notch.**

A : gradient normal de VEGF, bourgeonnement dirigé et prolifération cellulaire polarisée. B : VEGF diffus, sans gradient, bourgeonnement non dirigé et prolifération cellulaire augmentée et au hasard. C : Perte de la signalisation Dll4/Notch avec gradient de VEGF conservé et migration dirigé avec bourgeonnement et prolifération augmentée mais polarisée. (adapté de Gherhardt, 2007 : [http:// 3](http://3))

On observe des tip cells et des cellules endothéliales en prolifération tout le long des structures capillaires. Il n'y a plus de tiges néovasculaires mais des masses « de tip cells » qui constituent un front de migration dense en direction de la tumeur (figure 43).



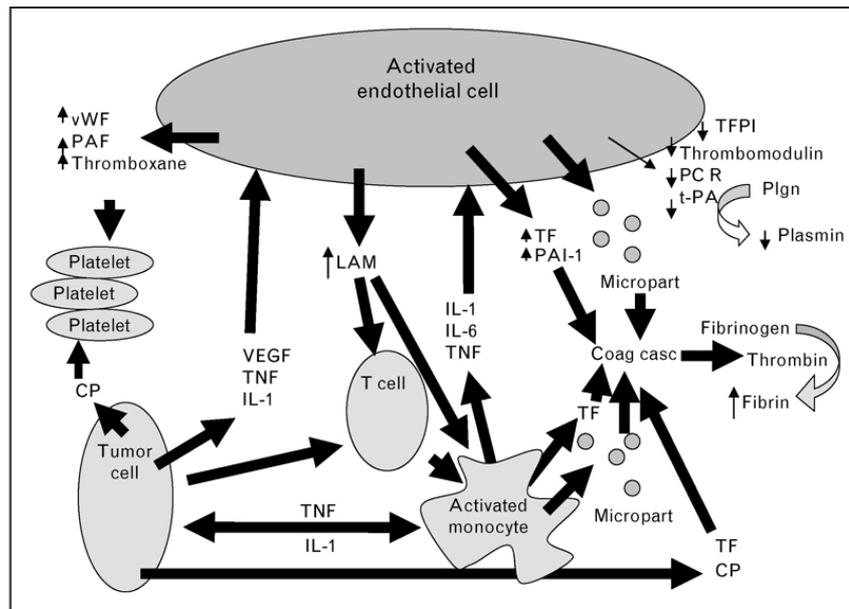
**Figure 43 : Structures capillaires tumorales *in vitro* avec inhibition ou non de la signalisation Dll4/Notch.**

d : témoins avec une signalisation Dll4/Notch fonctionnelle. e : après inhibition de la signalisation Dll4/Notch par le DAPT ((N-[N-(3,5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester). (adapté de Gherhardt, 2007 : [http:// 3](http://3))

Dans ces cellules, l'expression des intégrines angiogéniques est augmentée, favorisant la migration et la prolifération cellulaires.

### B.7.2 Phénotype procoagulant des cellules endothéliales tumorales

Toutes les cellules endothéliales tumorales ne montrent pas ce phénotype de « tip cell » en réponse au VEGF. Les cellules sous jacentes aux « tip cell » vont présenter un phénotype tumoral particulier différents des « stalk cell » physiologiques. Ce phénotype est procoagulant. Il est induit par l'action des cellules tumorales, et des macrophages essentiellement (24, 111).



**Figure 44 : Phénotype procoagulant de la cellule endothéliale tumorale.**

Différents facteurs procoagulants, pro-inflammatoires et pro-angiogéniques sont libérés par le phénotype aberrant de la cellule endothéliale tumorale en réponse aux cellules tumorales et aux macrophages. CP (protéine coagulante)  
(Tiré de Van Heeckeren et al, 2007)

En réponse au VEGF-A, au TNF- $\alpha$  et à l'IL-1 produits par les cellules tumorales mais également en réponse à l'IL-1, IL-6 et le TNF- $\alpha$  libérés par les macrophages, la cellule endothéliale va acquérir un phénotype procoagulant. Ce phénotype consiste à surexprimer à la surface membranaire le facteur tissulaire (FT) et surexprimer et libérer dans son micro-environnement y compris dans la circulation sanguine, le facteur von Willebrand (vWF), le facteur d'activation plaquettaire (PAF), le thromboxane A2 (TxA2) et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène PAI-1. De plus, la cellule endothéliale tumorale diminue son expression du récepteur membranaire à la protéine C (PCR) et de la thrombomoduline (inhibiteur de la thrombine), et diminue son expression et sa libération de l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI). Par diminution de sa libération du t-PA, elle réduit la formation de plasmine et donc la fibrinolyse du côté vasculaire, alors qu'elle surexprime uPA du coté matriciel favorisant ainsi la formation de plasmine importante à la protéolyse

matricielle pro-angiogénique. Par ailleurs, la cellule endothéliale libère des microparticules dont certaines portent le facteur tissulaire (24, 65, 111).

Ainsi, la régulation de la balance des acteurs prothrombotiques et anti-thrombotiques par la cellule endothéliale normale est, dans le contexte tumoral, complètement perturbée. La cellule endothéliale tumorale est essentiellement pro-coagulante et selon les types de cancers, en réponse à un switch angiogénique plus ou moins complexe, elle surexprimera ces différents facteurs en proportions variables apportant un risque thrombotique plus ou moins important.

## **B.8 Hémostase et angiogenèse tumorale**

Le phénotype pro-coagulant de la cellule endothéliale tumorale présente bien entendu un intérêt pour la tumeur.

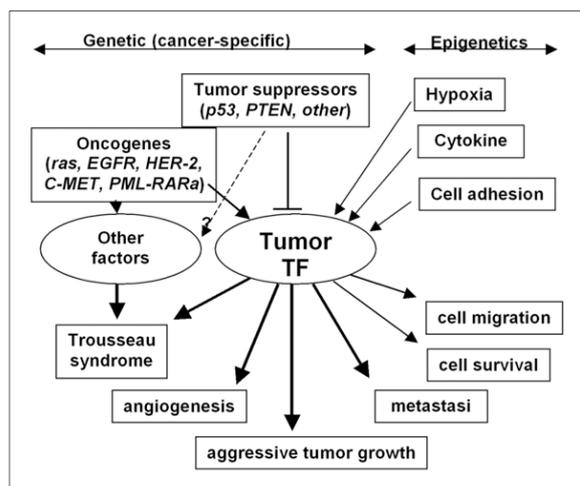
Depuis quelques années, l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases sont reconnues être sous le contrôle de l'hémostase (32, 40, 89) et, l'angiogenèse dans les hémopathies malignes n'échappe pas à ce contrôle.

Différents acteurs moléculaires ou cellulaires sont à l'interface de l'hémostase et de l'angiogenèse tumorale apportant ainsi au cours de l'angiogenèse tumorale un risque thromboembolique important. Parmi ceux-ci, nous trouvons le facteur tissulaire (FT) et la plaquette sanguine.

### **B.8.1 Facteur tissulaire et angiogenèse tumorale**

La cellule endothéliale tumorale de phénotype pro-coagulant surexprime le facteur tissulaire en réponse au VEGF. Mais elle n'est pas la seule puisque les macrophages, les cellules stromales et les cellules tumorales elles-même l'expriment également.

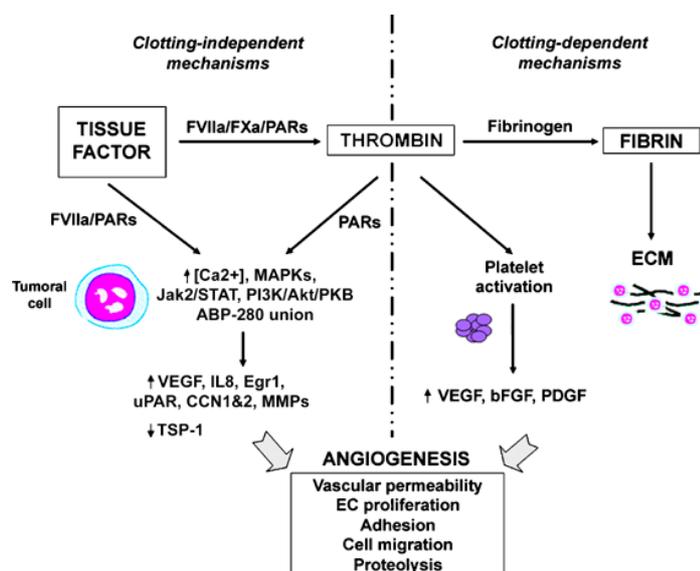
L'expression ou la surexpression du facteur tissulaire à la surface des cellules cancéreuses est sous le contrôle de différents événements génétiques ou environnementaux (épigénétiques) (figure 45) (83, 84).



**Figure 45 : Evénements induisant la surexpression du facteur tissulaire et conséquences pour la tumeur.** Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs sont très impliqués dans la régulation de l'expression du facteur tissulaire (FT). FT participe activement à la progression tumorale (Tiré de Rak et al, 2006).

Le facteur tissulaire, facteur clé de la cascade de coagulation qu'il initie, est également un agent clé de l'angiogénèse tumorale (60, 89), du processus métastatique et du développement tumoral en favorisant la croissance tumorale et la survie des cellules (60, 117) (figure 45). Son rôle important dans la progression tumorale fait de lui une cible thérapeutique potentielle (113).

Cette activité est retrouvée tant dans les tumeurs solides que dans les hémopathies malignes (60) et la densité des microvaisseaux est corrélée à la production du facteur tissulaire et de la coagulation induite (14).



**Figure 46 : Voies d'activation de l'angiogénèse tumorale par le facteur tissulaire dans les hémopathies malignes et dans les tumeurs solides**

Quelque soit la voie, le FT induit l'angiogénèse tumorale par surexpression du VEGF (tiré de Lopez-pedrer et al, 2006)

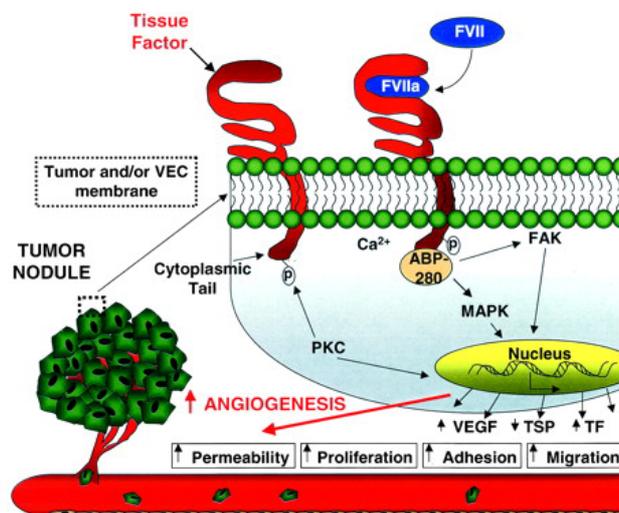
Quelque soit le type de tumeurs, solides ou hématologiques, le facteur tissulaire initie l'angiogénèse selon trois voies possibles : une voie indépendante de la cascade de la

coagulation et deux voies nécessitant l'activation de celle-ci avec formation de thrombine (figure 46) (60, 89). Toutes ces voies sont actives dans les cellules endothéliales mais également dans les cellules stromales, les macrophages et les cellules tumorales. Le facteur tissulaire est une glycoprotéine transmembranaire de 47Kda qui appartient à la classe II des récepteurs à cytokines. Son domaine extracellulaire a une structure proche de celle des récepteurs aux interférons  $\alpha$  et  $\beta$ . Son domaine cytosolique comporte deux sites de phosphorylation. L'un est phosphorylé après fixation du facteur VII sur le domaine extracellulaire, l'autre par action de la protéine kinase C (PKC) activée par une augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire.

### **B.8.1.1 Cas des tumeurs solides**

#### **♦ *Activité pro-angiogénique du FT indépendante de la cascade de la coagulation***

Le facteur tissulaire a une action pro-angiogénique indépendante de la cascade de coagulation lorsque son action fait intervenir ses deux sites de phosphorylation intracellulaire comme le montre la figure 47 (89).



**Figure 47 : Activité pro-angiogénique du Facteur tissulaire indépendamment de la cascade de coagulation dans le cas de tumeurs solides.**

Ce schéma concerne à la fois la cellule endothéliale et la cellule tumorale (tiré de Rickles et al, 2003)

Une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire est responsable de cette activité. Elle peut se faire avec ou sans formation du complexe FVII/FT. Elle active la PKC pour phosphoryler le domaine cytosolique et induit également la liaison de ce domaine cytosolique à la filamine ou ABP-280 (Actine binding protein 280) pour activer les voies de signalisation MPAK et FAK avec augmentation de l'adhésion des cellules et de leur migration. Ce mécanisme est valable tant pour la cellule endothéliale que pour la cellule

tumorale (89). Dans le cas où le complexe FVII/FT est présent, il pourrait induire l'angiogenèse en interagissant avec le récepteur de protéases activées-2 ou PAR-2 (Protease-activated receptors) (20).

Ainsi, la phosphorylation du domaine cytosolique par PKC, la fixation de ABP-280 et/ou l'action du PAR-2 induit une surexpression du VEGF mais également du facteur tissulaire réduit celle de la thrombospondine (TSP-1). Le VEGF par un rétrocontrôle positif induit l'expression du FT dans ces cellules (20, 74, 89).

#### ◆ *Activité pro-angiogénique du complexe FT/VII dépendant de la cascade de la coagulation*

L'activité angiogénique du facteur tissulaire via la cascade de coagulation nécessite la formation du complexe FVII/FT sur le domaine extracellulaire du FT avec activation du FVII.

L'activité angiogénique du complexe FVIIa/FT peut résulter alors de trois mécanismes distincts : l'un via le Facteur Xa, un autre via la thrombine et un dernier via la fibrine lors de la formation du thrombus. Ces trois mécanismes sont permis dans le stroma tumoral à cause de l'excessive perméabilité des vaisseaux tumoraux qui permettent l'extravasation de nombreuses protéines plasmatiques, voire des plaquettes.

##### ◇ *Activité pro-angiogénique du FT via le facteur Xa*

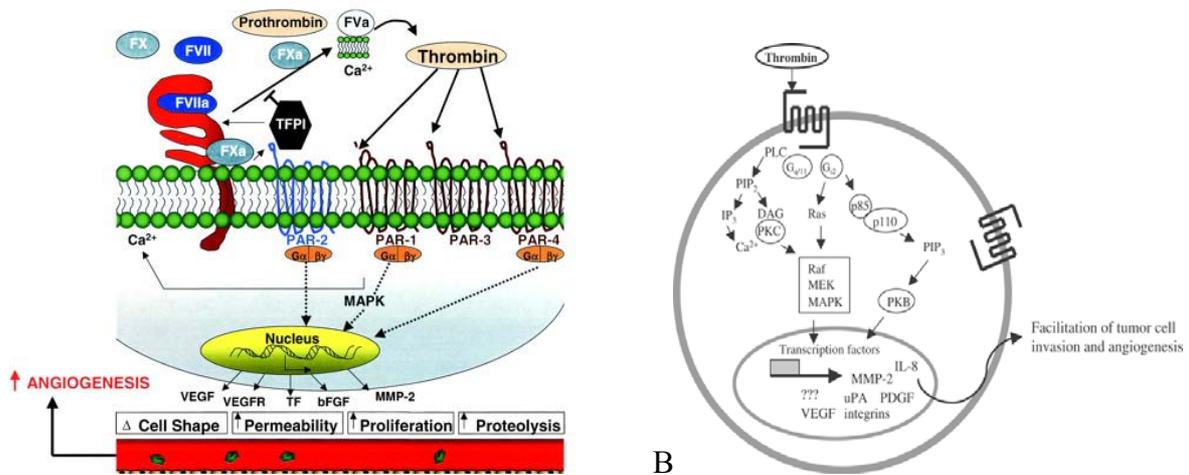
Au cours de la cascade de la coagulation, le complexe FVIIa/FT se lie au facteur X fixé à la membrane cellulaire en présence de calcium. Le facteur X est alors activé (Xa). S'il est maintenu associé au complexe par action du TFPI, il peut avoir une activité pro-angiogénique sur le récepteur PAR-2 (20, 89) (figure 48) en induisant la surexpression de molécules pro-angiogéniques comme VEGF, VEGFR, FT, b-FGF et MMP-2.

##### ◇ *Activité pro-angiogénique du FT dépendante de la thrombine*

En cas de déficit en TFPI, ce qui est souvent le cas dans l'angiogenèse tumorale, le facteur Xa se dissocie du complexe FVIIa/FT et va s'associer au facteur V fixé à la membrane cellulaire en présence de calcium pour former la prothrombinase qui convertit la prothrombine en thrombine (IIa).

La thrombine formée (ou encore libérée par les cellules tumorales) peut soit poursuivre la cascade de la coagulation soit, indépendamment de son activité procoagulante, induire l'angiogénèse en clivant les récepteurs PAR-1 et-4 afin de les activer. Le signal tumoral transmis par PAR-1 et PAR-4 se fait via une protéine G et induit la surexpression des

principales molécules impliquées dans l'angiogenèse et l'invasion vasculaires à savoir uPa, IL-8, VEGF, VEGFR, b-FGF, PDGF, MMP-2 et différentes intégrines (93).



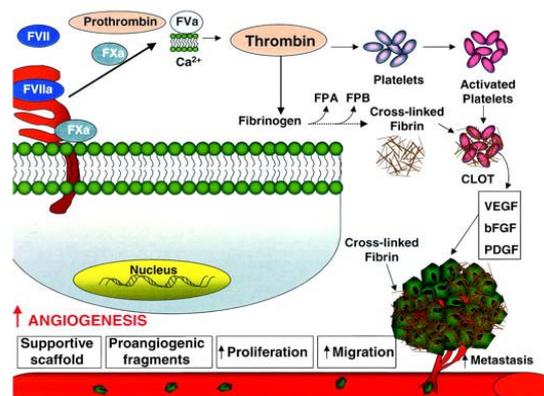
**Figure 48 : Activité pro-angiogénique du FT via le facteur Xa ou la thrombine dans les tumeurs solides.**

A : Seule l'interaction de la thrombine avec les PAR-1 et -4 est pro-angiogéniques. B : Exemple de mécanisme angiogénique induite par la thrombine sur le récepteur PAR-1. (Tiré de Rickles et al, 2003)

Il en résulte une plasticité de la cellule endothéliale, une augmentation de la perméabilité vasculaire, une augmentation de la prolifération cellulaire endothéliale et une augmentation de la protéolyse matricielle.

◇ Activité pro-angiogénique du FT dépendante du thrombus.

La dernière voie par laquelle le complexe FVIIa/FT peut induire l'angiogenèse est celle impliquant la formation du thrombus. Après activation des plaquettes et formation de la fibrine par action de la thrombine sur le fibrinogène, les plaquettes libèrent, en formant le thrombus, des facteurs pro-coagulants contenus dans ses granules  $\alpha$  : VEGF, b-FGF et PDGF-B.



**Figure 49 : Activité pro-angiogénique du thrombus dans le cas de tumeurs solides.**

(Tiré de Rickles et al, 2003)

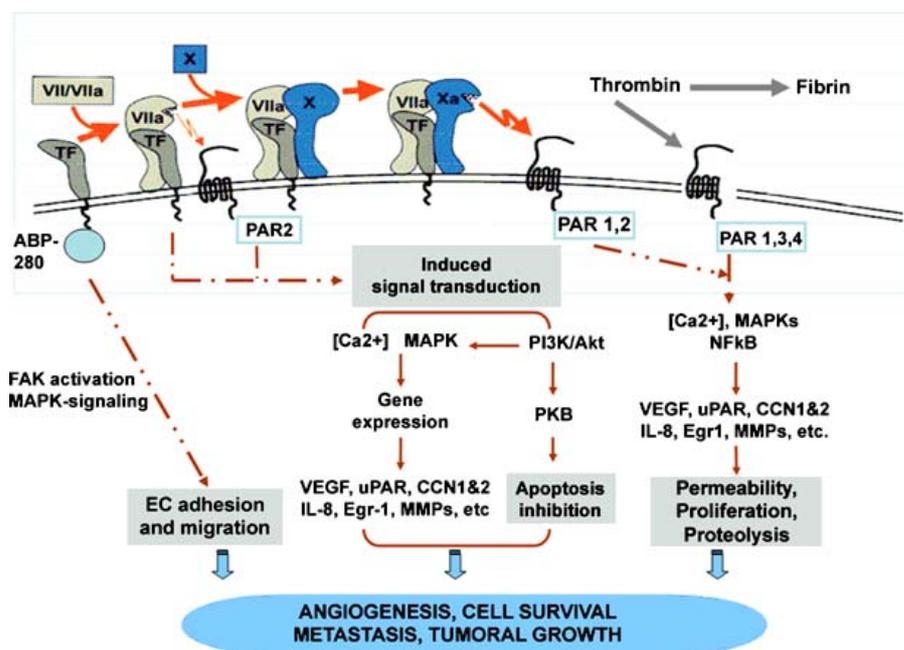
Ces facteurs favorisent la croissance tumorale, la prolifération et la migration des cellules endothéliales tumorales. Le VEGF induit une augmentation de perméabilité vasculaire suivie d'une extravasation aux abords des cellules tumorales des protéines de la coagulation telle que le fibrinogène qui, transformé en fibrine, favorisera la migration endothéliale et la tubulogénèse.

La fibrinolyse du thrombus par la plasmine permettra aussi l'activation des MMPs.

Ainsi, le facteur tissulaire surexprimé dans les cellules tumorales mais également dans les cellules endothéliales tumorales sous l'action du VEGF offre une activité pro-angiogénique très puissante. Cependant, ce facteur tissulaire garde parallèlement son activité prothrombotique et constitue, de ce fait, un facteur de risque thromboembolique très important chez les patients atteints de cancers.

### **B.8.1.2 Cas des hémopathies malignes**

Ces mécanismes d'activation de l'angiogénèse par le facteur tissulaire décrits pour les tumeurs solides sont identiques, dans leur grande ligne, pour les tumeurs hématologiques comme en témoigne la figure 50.



**Figure 50 : Signalisations pro-angiogéniques induites par le facteur tissulaire dans le développement des hémopathies malignes**  
(tiré de Lopez-pedrer et al, 2006).

Le facteur tissulaire est, par conséquent, un élément essentiel de l'angiogénèse tumorale et du risque thromboembolique encouru par les patients atteint d'un cancer.

Mais il n'est pas le seul. En effet, il a été démontré que les plaquettes intervenaient elles aussi.

## **B.8.2 Plaquettes et angiogenèse tumorale**

Compte-tenu du contrôle de l'angiogenèse par l'hémostase, il apparaissait évident que la plaquette n'échappait pas à une activité pro-angiogénique. Le nombre et l'état d'activation des plaquettes interviennent dans cette activité pro-angiogénique ou métastatique.

Il existe en effet une corrélation entre le nombre de plaquettes et le pronostic d'évolution de différentes pathologies cancéreuses chez l'homme (comme les cancers du poumon, du rein, gastrique, colorectal et du sein). Plus le nombre de plaquettes est élevé, plus le pronostic vital des patients diminue (32).

Pour promouvoir l'angiogenèse tumorale, le processus métastatique mais également l'inflammation tumorale, les plaquettes doivent être activées.

### **B.8.2.1 Rôles pro-angiogéniques des plaquettes activées**

L'activation des plaquettes intervient dans différentes étapes du développement tumoral.

Lors de leur activation par la thrombine (via les PARs) très présente dans les tumeurs ou par les cellules tumorales, elles libèrent différentes molécules stockées dans leurs granules et ayant une activité dans la tumorigenèse. Ces molécules sont regroupées dans le tableau 14.

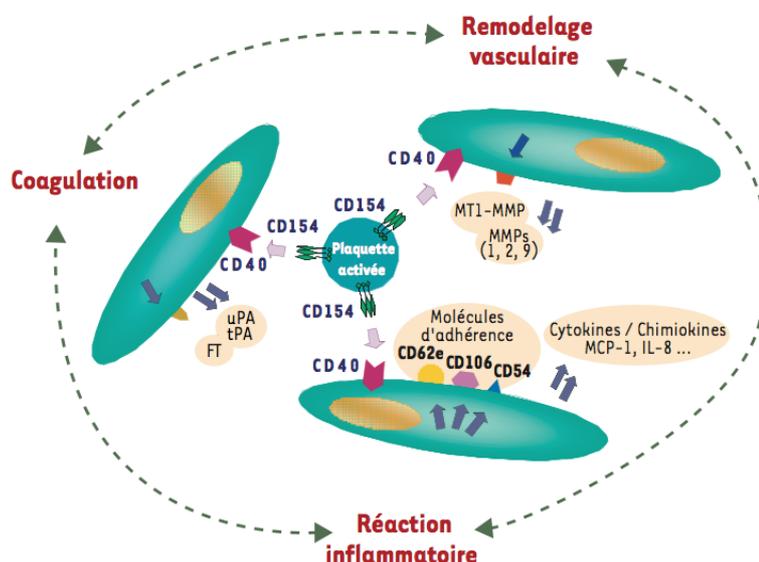
<b>Rôle</b>	<b>Molécules contenues dans les granules des plaquettes</b>	<b>Molécules hors granules</b>
mitogène		12 (S)- HETE LPA(acide lysophosphatidique)
pro-angiogénique	VEGF PDGF b-FGF TSP-1 (forte concentration) TGF-β1 HGF PAI-1 (faible concentration) Angiopoïétine-1	
anti-angiogénique	TSP-1 (faible concentration) Facteur plaquettaire-4 PAI-1 (forte concentration) TGF-β1 Fragment d'HGF endostatine	
pro-agrégants ou adhésifs	ADP Sérotonine TSP-1 Thromboxane A2 P-Sélectine FvW Fibrinogène Fibronectine αIIbβ3	12 (S)- HETE

**Tableau 14 : Rôle des différentes molécules stockées et libérées par les plaquettes**  
(modifié de Fribourg et al, 2006).

Les plaquettes ont une action pro-angiogénique indiscutable par les facteurs qu’elles stockent et libèrent lorsqu’elles sont activées tels que VEGF, b-FGF, PDGF, etc. contrebalancée par les facteurs anti-angiogéniques tels que PF-4, TSP-1, endostatine, etc.

Parallèlement, elles favorisent la prolifération des cellules tumorales en induisant leur mitose.

Cette activité pro-angiogénique des plaquettes activées est renforcée par l’expression, à leur surface membranaire, du CD154 (ou CD40L). C’est le ligand du CD40, récepteur retrouvé sur de nombreuses cellules comme la cellule endothéliale, le macrophage et certaines cellules tumorales y compris dans les hémopathies malignes. Par ce récepteur, la plaquette est un acteur clé au carrefour de l’hémostase, de l’angiogénèse et de la réaction inflammatoire (figure 51) (22).



**Figure 51 : Interaction de la plaquette avec la cellule endothéliale par le couple CD154/CD40 dans l’hémostase, l’angiogénèse et l’inflammation**  
(tiré de Delmas et al, 2005).

Dans le cas de l’angiogénèse, l’interaction des plaquettes via le CD154 avec la cellule endothéliale exprimant le CD40 induit l’expression des MMP-1, -2, -9, de la MT-MMP1, de uPA, et par cela la production de plasmine, mais également l’expression du facteur tissulaire (ainsi que sur les monocytes) conférant ainsi à la cellule endothéliale un phénotype pro-angiogénique et procoagulant. Par ce récepteur, les plaquettes peuvent également réguler l’expression du VEGF des cellules tumorales dans les hémopathies malignes (cf figure 37)

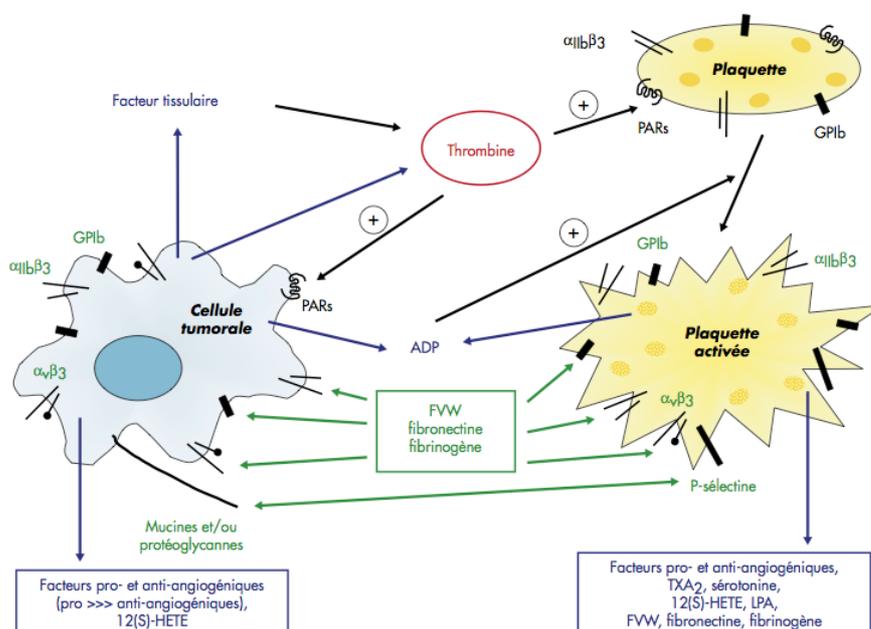
### B.8.2.2 Rôle prométastatique des plaquettes activées

En supplément de cette activité pro-angiogénique, les plaquettes s'avèrent très impliquées dans le processus métastatique. En absence de plaquettes, ce processus ne peut être mené à son terme mais il est tout de même peu efficace en leur présence puisque malgré plusieurs millions de cellules tumorales gagnant sans cesse la circulation sanguine, moins de 0,1% y survivent grâce à l'activité du système immunitaire (32).

Les cellules tumorales qui survivent lors de leur passage dans la circulation sanguine le doivent aux micro-embols qu'elles forment en s'associant aux plaquettes et aux leucocytes.

L'interaction plaquettes - cellules tumorales est rendue possible après activation des plaquettes par les cellules tumorales afin de leur faire exprimer leurs molécules potentiellement adhésives que sont le vWF, le fibrinogène, les intégrines et la P-Sélectine.

L'interaction se fait transitoirement via la P-Sélectine plaquettaire et des glycoprotéines tumorales puis est stabilisée par des ponts de fibrinogène, de vWF ou de fibronectine entre les différentes glycoprotéines (GPIb tumorale ou GpIb plaquettaire) et intégrines ( $\alpha_{IIb}\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_3$ ) retrouvées à la surface de ces deux types cellulaires (figure 52). Elle peut également avoir lieu via le CD154 plaquettaire et le CD40 des cellules tumorales (22).



**Figure 52 : Interactions entre les cellules tumorales et les plaquettes et conséquences biologiques.**

(Les récepteurs et protéines adhésives potentiellement impliqués dans l'interaction cellule tumorale-plaquettes sont en vert ; Le rôle clé de la thrombine dans la tumorigenèse est indiqué en rouge es danstiré de Fribourg et al, 2006)

Le gainage des cellules tumorales par les plaquettes leur offre ainsi, dans la circulation sanguine, une protection contre les forces de cisaillement et contre l'action du système immunitaire cellulaire soit par libération plaquettaire du 12(S)-HETE (acide 12(S)-

hydroxyeicosatétraénoïque) qui protège de la cytotoxicité du TNF- $\alpha$ , soit en l'isolant simplement de l'action des cellules NK (Natural Killer).

Par la suite, ces agrégats de plaquettes, cellules tumorales et leucocytes, facilitent l'extravasation des cellules tumorales et le processus métastatique. Ceci est permis par l'action des molécules pro-adhésives plaquettaires vWF, fibronectine, fibrinogène et par la libération de 12(S)-HETE par les plaquettes activées et les cellules tumorales qui induit une rétractation des cellules endothéliales nécessaire à l'extravasation des cellules tumorales.

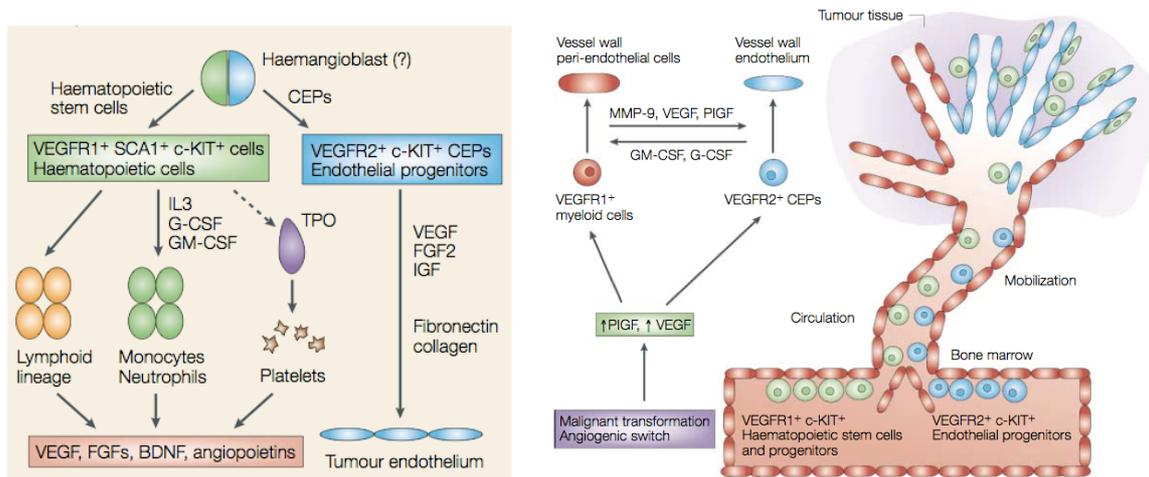
Au cours de ce processus métastatique, la cellule tumorale, exprimant elle aussi le facteur tissulaire, devient prothrombotique dès lors qu'elle envahit le lit vasculaire. Ceci est d'autant plus vrai qu'elle interagit facilement avec les plaquettes qu'elle active au cours de ce phénomène d'invasion vasculaire et de métastases.

### **B.9 Cellules souches hématopoïétiques, précurseurs endothéliaux et angiogenèse tumorale**

Une autre particularité de l'angiogenèse tumorale est le recrutement de précurseurs endothéliaux circulants dérivés de la moelle osseuse (CEPs) en complément des cellules endothéliales des capillaires adjacents à la tumeur. Ils sont recrutés par chimiotactisme par les facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF, PlGF libérés par la cellule tumorale mais également par le SDF-1 libéré par les fibroblastes activés (CAFs). Ces précurseurs s'incorporent à la vascularisation tumorale en développement.

Ce recrutement des précurseurs endothéliaux (VEGFR-2+, VEGFR-1-) est essentiel à l'angiogenèse tumorale et leur incorporation dans les néovaisseaux tumoraux est facilitée par la co-mobilisation des cellules souches hématopoïétiques (VEGFR1+) selon un mécanisme mal connu (figure 53) (80, 81, 82).

Ces cellules souches hématopoïétiques et les cellules tumorales libèrent sous la dépendance de HIF-1 (25) des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, MMP-9, PlGF) qui induisent et favorisent l'angiogenèse. En retour, les progéniteurs endothéliaux circulants (CEPs) libèrent des facteurs de croissance (GM-CSF, G-CSF) qui induisent la maturation de certaines cellules hématopoïétiques en monocytes puis macrophages pro-angiogéniques. Les CEPs s'incorporent dans les néovaisseaux permettant la croissance de leur diamètre ou de nouveaux bourgeonnements. Cette incorporation est facilitée par l'action des plaquettes. (80, 81).



**Figure 53 : Co-mobilisation des cellules hématopoïétiques et des précurseurs endothéliaux circulants.**

Implications dans l'angiogenèse tumorale. Schéma de droite : les cellules VEGFR-1+ devraient être de couleur verte (d'après Rafii et al, 2002).

Certains facteurs de croissance hématopoïétiques peuvent avoir une fonction pro-angiogénique. Ainsi le G-CSF participerait également par une action mitogène sur les cellules endothéliales et induirait une néovascularisation médullaire comme cela a déjà été démontré dans le cas des tumeurs solides.

L'érythropoïétine aurait également un rôle mais très complexe. Elle peut être pro-angiogénique en stimulant directement la prolifération des cellules endothéliales et leur migration ou indirectement en stimulant l'expression de facteurs impliqués dans l'hypoxie et permettant la surexpression du VEGF. Mais elle peut être également anti-angiogénique par le fait que son objectif est de réduire l'hypoxie et donc de diminuer l'expression des facteurs pro-angiogéniques induite par celle-ci. L'ensemble de ces effets n'est pas encore bien compris.

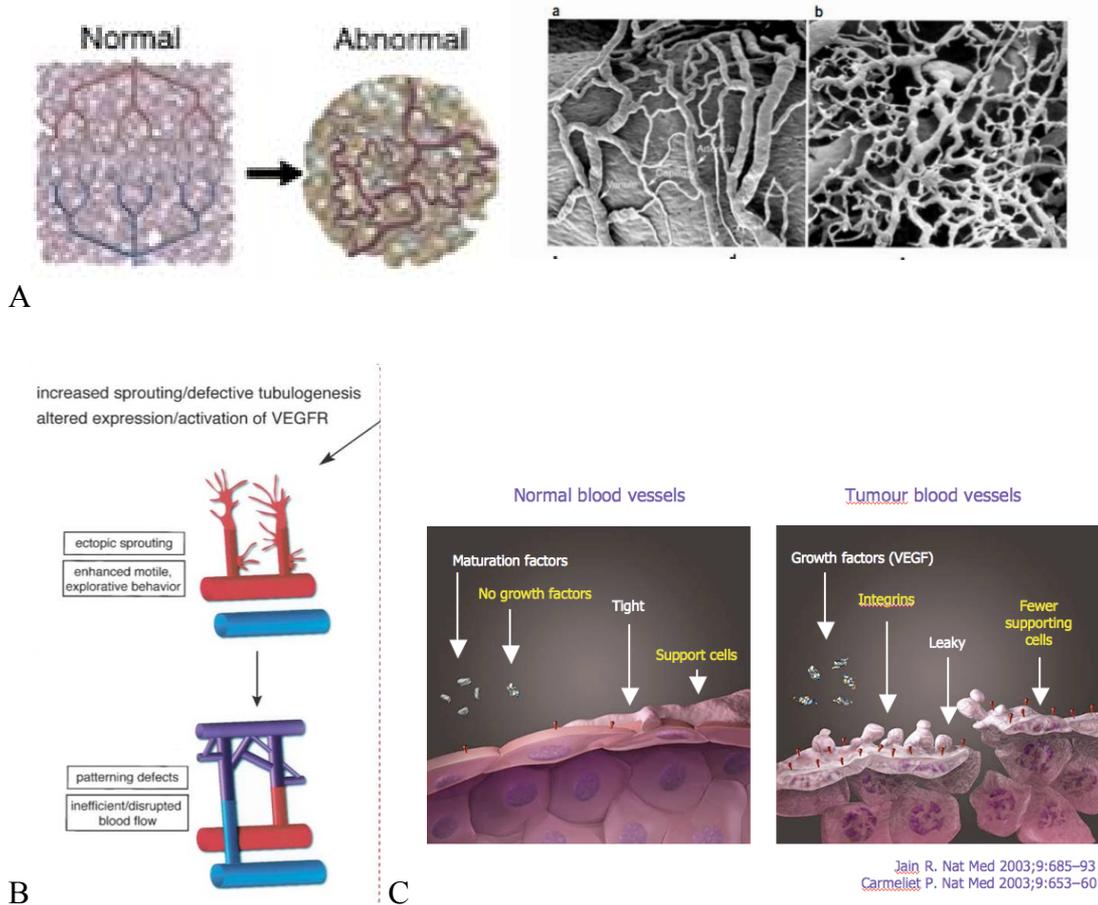
## **B.10 Structure et fonction des vaisseaux tumoraux**

Dans ce contexte de remodelage permanent où les cellules endothéliales tumorales ont un phénotype pro-angiogénique irrégulé avec libération sans cesse d'agents pro-angiogéniques, d'enzymes de dégradation matricielle, de composants matriciels et où des précurseurs endothéliaux s'enchassent dans l'assise endothéliale à tout moment, la maturation des vaisseaux est délicate voire impossible.

Les cellules endothéliales ne peuvent entrer en quiescence. L'angiopoïétine 2 et le VEGF-A sont sans cesse surexprimés dans la tumeur ce qui ne permet pas la mise en place de jonctions efficaces entre les cellules endothéliales et le recrutement efficace des péricytes.

Une membrane basale est néanmoins secrétée mais conjointement aux systèmes de protéolyse (MMps et uPA/uPAR/PAI-1). Par conséquent, la membrane basale n'est pas intègre et ne permet pas, là encore, aux cellules endothéliales d'entrer en quiescence.

Par ailleurs, le VEGF-A étant synthétisé en permanence, la régression des vaisseaux inutiles ne peut se faire pour permettre une hiérarchisation du réseau vasculaire.



**Figure 54 : Architecture vasculaire tumorale et perfusion**

A : a, vasculature normale, b, tumorale. B : Flux sanguin dans les vaisseaux tumoraux : il circule dans la tumeur du sang mêlé. C : Parois capillaires normale et tumorale. (adapté d'après Roca et al, 2007, Fukumura et al, 2007 et Carmeliet et al, 2003))

De cette angiogenèse aberrante, irrégulière et en constante activité, il résulte un ensemble de vaisseaux courts mais larges et très tortueux, plus ou moins perfusés et aux multiples voies sans issue. La paroi vasculaire présente une perméabilité excessive, la membrane basale est discontinue et les cellules endothéliales expriment des intégrines angiogéniques. (figure 54).

Une fuite permanente de protéines plasmatiques accompagnée de la production de thrombine pro-angiogénique et de fibrine facilite la migration des cellules endothéliales et tumorales, ainsi que de plasmine qui stimule la protéolyse matricielle en activant les MMPs. Le stroma tumoral qui en résulte est gélatineux, en perpétuel remaniement dans lequel règne

une pression interstitielle élevée incompatible avec une diffusion dirigée des nutriments et de l'oxygène du vaisseau vers le tissu tumoral.

La perfusion dans ces vaisseaux tumoraux est aléatoire, alternative, le sens de flux varie d'un moment à l'autre par manque de hiérarchisation des vaisseaux. Tantôt un sang artériel les irrigue tantôt un sang veineux (14, 48, 91)

Cette architecture vasculaire inappropriée et la pression régnant dans le stroma tumoral ne permettent pas un apport nutritionnel rentable pour la tumeur qui, pour poursuivre son développement, continue son activité pro-angiogénique.

## **C - THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES EN ETUDE CLINIQUE**

Dans l'objectif de mieux traiter les pathologies cancéreuses, la vascularisation tumorale est devenue depuis quelques années une cible nouvelle pour un nouvel espoir car toutes les tumeurs solides ou les nombreuses hémopathies malignes ont montré une dépendance vis à vis de l'angiogenèse.

L'angiogenèse offre ainsi une cible universelle, indépendante du type tumoral. Par ailleurs, les cellules endothéliales normales sont des cellules démontrées comme génétiquement stables et donc présentent peu de risques de développer des résistances aux thérapies.

Il existe environ 300 inhibiteurs de l'angiogenèse identifiés et environ 80 seraient en études cliniques. Cet engouement pour les thérapies anti-angiogéniques est dû à l'efficacité rapide des anti-VEGF (bevacizumab) sur la vascularisation tumorale. Non seulement ils inhibent son développement mais ils induisent également sa régression. Les vaisseaux montrent une phase de normalisation (34) c'est-à-dire qu'ils récupèrent une perméabilité et une structure adéquates avec réapparition d'une hiérarchisation artérioveineuse puis ils régressent. Ces thérapies anti-angiogéniques sont en général associées à la chimiothérapie ou la radiothérapie qui permettent, durant la phase de normalisation, d'être plus efficaces contre la tumeur respectivement parce que les cytotoxiques peuvent diffuser vers les cellules tumorales, et parce que la tumeur est mieux oxygénée.

Cependant, les thérapies doivent cibler spécifiquement la vascularisation tumorale et en aucun cas la vascularisation normale. Pour tenter de répondre à cette discrimination indispensable, les premières thérapies anti-angiogéniques ont ciblé la signalisation VEGF/VEGFR en s'appuyant sur le fait que les cellules endothéliales dans l'organisme sont quiescentes (seuls 0,01% seraient en division), ne sont donc pas réceptives au VEGF et n'expriment pas le VEGFR. Cibler le VEGF ou le VEGFR consistait par conséquent à cibler spécifiquement les cellules endothéliales aux phénotypes angiogéniques et donc tumorales chez l'adulte en dehors des phases d'angiogenèse physiologique que nous avons déjà citées. Le développement d'agents inhibiteurs des intégrines a suivi le même raisonnement.

Le tableau 15 regroupe les principales molécules anti-angiogéniques en essais cliniques en 2007 ainsi que leurs cibles et les événements vasculaires constatés.

Cibles thérapeutiques		Molécules en essais cliniques		Type de molécules	Essais en 2007	Evènements
Facteurs pro-angiogéniques	VEGF	Cellule endothéliale	Bevacizumab – AVASTIN®	Ac monoclonaux	I, II, III,	Hémorragies HTA, ETEV, ETEA
	VEGF	CE	VEGF-Trap	Protéine de fusion	I	
Récepteurs proangiogéniques	VEGFR2	CE	IMC-IC11	Ac monoclonaux	I	
	VEGFR-1, -2, PDGFR, Raf, c-Kit, FLT-3	CE C. tumorale Péricytes	Sorafenib tosylate BAY 43-9006 NEXAVAR®	TKI	I, II, III	Hémorragies HTA, IDM
	VEGFR-1, -2, PDGFR,	CE C. tumorale Péricytes	Sunitinib malate SU11248 SUTENT®	TKI	I, II, III	Hémorragies HTA, ETEA
	VEGFR-1, -2, PDGFR,	CE	Vatalanib PTK787/ZK222584	TKI	I, II	HTA, ETEV AVC
	VEGFR-1, -2, -3 EGFR	CE C. tumorale	Vandelanib ZD6474 ZACTIMA®	TKI	I, II, III	
	VEGFR-2 PDGFR	CE C. tumorale	Codiranib AZD2171 (oral)	Inhibiteur multikinases	I, II, III	
	VEGFR-1, -2 PDGFR FGFR	CE C. tumorale Péricytes	CHIR-258	Inhibiteur multikinases	I	HTA
	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR, c-Kit	CE C. tumorale Péricytes	AMG-706	Inhibiteur multikinases	III	
	VEGFR-1, -2, -3 PDGFR, c-Kit	CE C. tumorale Péricytes	Pazopanib GW786034	Inhibiteur multikinases	II, III	
Inhibiteur de la prolifération cellulaire	CD-36 endothéliale	CE	ABT-510	Analogue peptidique de la TSP-1	I et II	
	uPA, tPA, Annexine II	CE	Angiostatine	Protéines recombinante	I, II	Accident ischémique ETEV, AVC, Hémorragies
	Intégrine $\alpha_5\beta_1$ , VEGFR 2 indirecte	CE	Endostatine	Protéine recombinante	I, II	Hémorragies, IDM
	VEGF, b-FGF,	CE	Thalidomide	IMiD	I,II, III,	ETEV
		CE	Lenalidomide REVLIMID	IMiD	I, II, III,	ETEV
	CE	Actimid	IMID	I	ETEV	
Intégrines angiogéniques	$\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$	CE	Cilengitide EMD12194	antagoniste	I et II	
	$\alpha_v\beta_3$	CE	Vitaxine®	AC monoclonal	I, II	
MMPs	-1, -2, -3, -7, -9		marimastat		III	
	-2, -9		Prinomastat		III	
	-1, -2, -8, -9, -13, -14		BMS 275291		III	
	-2, -9, -12, VEGFR-1		Neovastat		III	
autres	PDGFR, C-Kit, Bcr-Abl	Péricytes C. tumorale	Mesylate d'imatinib Glivec®	TKI	I, II, III,	
	EGFR	C. tumorale	Gefitinib, erlotinib,	TKI		

**Tableau 15 : Principales molécules anti-angiogéniques en essais cliniques en 2007, principaux modes d'action et événements vasculaires indésirables rapportés.**  
(12, 29, 50, 96, 111)

La plupart de ces thérapies anti-angiogéniques ont pour objectif d'induire la mort des cellules endothéliales tumorales, d'inhiber leur prolifération et/ou leur migration. On retrouve ainsi, en cours d'essais cliniques des agents ciblant principalement

- la cellule endothéliale en ciblant la voie du VEGF par inhibition directe du VEGF ou par inhibition de l'activité tyrosine kinase de ses récepteurs VEGFR-1 et -2 , ou encore en ciblant les intégrines.

- la cellule tumorale en ciblant les récepteurs à tyrosine kinase tels que le PDGFR, EGFR

- la matrice extracellulaire en ciblant les métalloprotéases matricielles MMPs.

**D - THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES ET RISQUE  
THROMBOTIQUE**

L'association entre la survenue d'événement thromboembolique et le cancer a été établie dès 1865 par le Professeur Trousseau qui a donné son nom à ce syndrome.

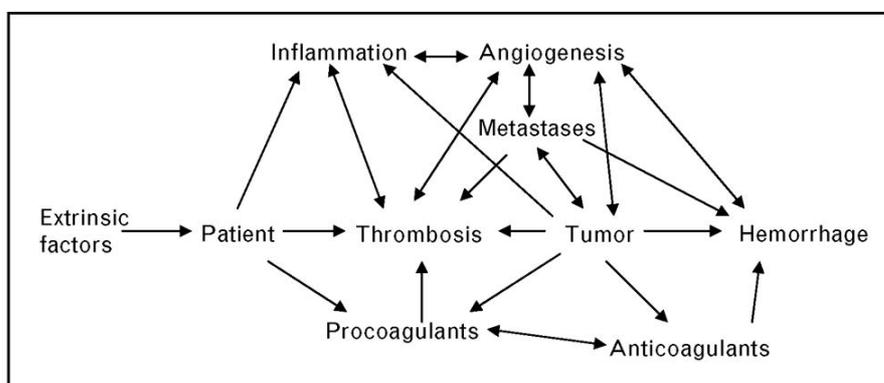
## **D.1 Thromboses et Cancer**

### **D.1.1 Facteurs de risque**

La survenue d'un événement thromboembolique chez les patients atteints d'une pathologie néoplasique est particulièrement fréquente en raison de l'accumulation de facteurs de risque secondaires à cette pathologie ou primaire qu'ils présentent.

Les facteurs de risques secondaires décrits, mais pour lesquels un lien physiopathologique n'est pas formellement identifié, sont l'âge, avec une incidence de 1/100 000 avant 20 ans versus 1/100 après 75 ans, la chirurgie, l'immobilisation, la ménopause, les voies veineuses centrales, ainsi qu'une thrombophilie constitutionnelle (résistance à la protéine C activée, mutation du facteur II, déficit en protéines C, S ou en antithrombine, ou encore hyperhomocystéinémie) et une hypercellularité sanguine (leucocytose).

Ainsi ces patients constituent une population à risque majoré de survenue d'événements thromboemboliques et il n'est pas rare que de tels événements soit la manifestation inaugurale d'un cancer occulte (72). Majoritairement ce sont des thromboses veineuses profondes (TVP) des membres inférieurs avec ou sans embolie pulmonaire. Cependant des cas de TVP des membres supérieurs, intra-abdominales ou encore des sinus veineux cérébraux sont également retrouvés. L'ensemble de ces événements est responsable d'une morbidité non négligeable chez ces patients avec un risque supplémentaire d'accidents hémorragiques sous traitement anticoagulant. L'ensemble des interrelations qui peuvent exister chez le patient entre la thrombose, la tumeur, les hémorragies, l'inflammation, l'angiogenèse, les métastases, les facteurs procoagulants et les facteurs anticoagulants est schématisé dans la figure 55.



**Figure 55 : Altération de la régulation des états thrombotique et hémorragique par les cellules tumorales.**  
(tiré de van Heeckeren et al, 2007)

### **D.1.2 Physiopathologie**

La physiopathologie de ces événements associés au cancer peut être expliquée par les éléments de la triade de Virchow :

-stase vasculaire due au flux sanguin aberrant dans la vascularisation tumorale, mais également à la compression veineuse par la tumeur et à une hypercellularité sanguine par suite de l'action des facteurs de croissance libérés lors de l'angiogenèse tumorale. Cette stase est également favorisée par l'immobilisation des patients.

-altération de la paroi vasculaire due à une structure des néo-vaisseaux instable mais également à l'implantation des voies veineuses centrales ou à l'action des cytotoxiques.

-hypercoagulabilité due au phénotype procoagulant de la cellule endothéliale tumorale, des cellules du stroma et de la cellule tumorale avec libération de facteurs procoagulants et surexpression du facteur tissulaire comme nous l'avons décrit. L'activation de la cascade de la coagulation et la fibrinolyse sont ainsi augmentées et renforcées par l'action des monocytes et macrophages. Il en résulte une augmentation des facteurs de la coagulation et surtout de la thrombine (avec déséquilibre thrombine/anti-thrombine), de la fibrine et des D-Dimères. L'hypercoagulabilité est renforcée dans les cancers métastasés par la présence dans la circulation sanguine de cellules tumorales exprimant le facteur tissulaire et activant les plaquettes.

### **D.1.3 Incidence**

L'incidence de pathologies thrombotiques chez les patients atteints d'un cancer est difficile à établir. Néanmoins, le risque de survenue chez ces patients est jusqu'à 4 fois plus élevé que dans la population « normale » (23).

Il n'est pas rare que des événements thromboemboliques précèdent le diagnostic de la pathologie cancéreuse. La moitié des cancers diagnostiqués dans l'année suivant une manifestation thromboemboliques concerne les poumons, la prostate, le sein, le pancréas, le colon et le rectum (23).

Les incidences de ces événements sont augmentées par la présence des métastases, 15% dans le cancer du sein métastasés contre 2 à 10% sans métastase.

Les thérapeutiques anticancéreuses apportent leur part de risque à la survenue de ces événements thromboemboliques.

#### **D.1.4 Thérapeutiques anticancéreuses**

Les thérapeutiques anticancéreuses, quelqu'elles soient, constituent un facteur de risque supplémentaire dans la survenue de thromboses veineuses ou même artérielles, d'embolie pulmonaire ou de coagulation intravasculaire disséminée (23, 32).

La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie mais également les facteurs de croissances hématopoïétiques comme l'érythropoïétine et le G-CSF sont impliqués dans la survenue d'événements thromboemboliques : des thromboses veineuses profondes (TVP) dans la majorité des cas.

Les thérapies ciblées, quant à elles, ne font pas exception et, parmi les plus incriminées, on retrouve les thérapies anti-angiogéniques (23) .

### **D.2 Molécules anti-angiogéniques et événements thrombo-emboliques**

Les thérapeutiques anti-angiogéniques ayant donné lieu à des événements thromboemboliques sont celles affectant directement la cellule endothéliale. On trouve ainsi les **inhibiteurs de la voie de signalisation VEGF/VEGFR**, les **analogues des inhibiteurs endogènes** de l'angiogenèse tels que l'endostatine, l'angiostatine, les **immunomodulateurs indirects** IMIDs tels que la thalidomide et ses dérivés. Dans le tableau 15 sont reportés les événements thrombo-emboliques déclarés pour certains agents anti-angiogéniques. Dans la figure 56, les différents mécanismes d'action des principaux traitements anti-angiogéniques sont représentés.

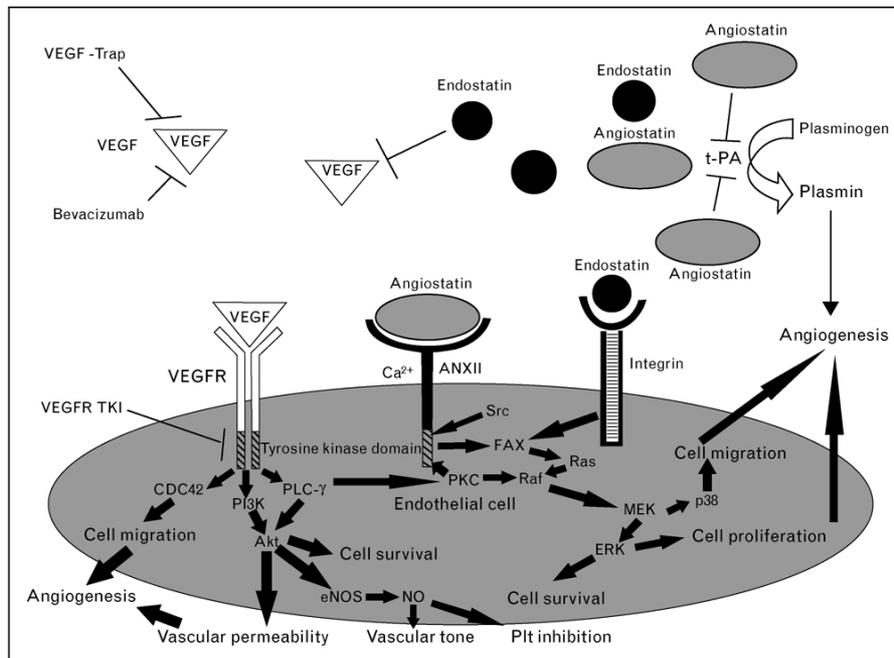
#### **D.2.1 Inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR**

La signalisation VEGF/VEGFR très active dans l'angiogenèse tumorale peut être interrompue par action soit sur le VEGF soit sur ses récepteurs VEGFR-1, -2 et/ou-3.

##### **D.2.1.1 Antagonistes directs du VEGF**

Parmi les antagonistes directs du VEGF, les cliniciens disposent de deux molécules à administration intraveineuse, le bevacizumab et le VEGF-Trap. Ces antagonistes se fixent au VEGF et empêchent ainsi sa fixation à ses récepteurs VEGFR-1 et 2. Il en résulte un arrêt de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. Par conséquent, de nouveaux

vaisseaux ne peuvent se former retardant ainsi le développement de la tumeur et l'apparition de métastases. Concernant les vaisseaux tumoraux déjà en place, les antagonistes du VEGF permettent une maturation des vaisseaux appelée « normalisation ». Les vaisseaux se hiérarchisent, se stabilisent et récupèrent une perméabilité adéquate. L'extravasation des protéines plasmatiques diminue, permettant ainsi un retour à une pression interstitielle tumorale « normale » nécessaire à une délivrance efficace des cytotoxiques.



**Figure 56 : Principales cibles anti-angiogéniques et mécanismes d'actions.**  
(tiré de van heeckeren et al., 2007)

◆ **Bevacizumab (AVASTIN®)**

Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre tous les types de VEGF. Il est approuvé par la FDA dès 2004 pour le traitement en première ligne du cancer colorectal métastatique en association avec le 5-FU et le cancer du poumons non à petites cellules. Il obtient l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 2006 mais fait toujours l'objet de très nombreux essais cliniques pour l'ensemble des autres cancers en association avec les traitements cytotoxiques. Il se révèle efficace dans le traitement des leucémies aigües, des cancers de l'ovaire, du pancréas, du sein ainsi que dans les sarcomes, les gliomes et le carcinome cellulaire rénal.

Les effets secondaires à son utilisation sont le plus souvent une hypertension, une protéinurie, des épistaxis, des infections respiratoires hautes, des gastrites et diarrhées.

Plus rarement, de sérieux effets tels qu'un événement thromboembolique veineux ou artériel, une perforation intestinale, une microangiopathie thrombotique rénale, un infarctus du myocarde et un retard de cicatrisation sont observés (23, 24, 50, 111).

Un traitement antiplaquettaire pour un antécédent d'événements thromboemboliques artériels (E TEA) ou une anticoagulation chronique ne sont pas des contre-indications absolues à la prescription du bevacizumab, vu qu'il n'a pas été constaté de risque hémorragique (111).

Une augmentation significative du nombre d'événements thrombotiques a été observée par trithérapie, 5-FU, acide folinique et bevacizumab (19, 4%) chez des patients atteints d'adénocarcinome colique métastaté comparé à la bithérapie n'incluant pas le bevacizumab (8,1%, étude de phase II). Des augmentations similaires de l'incidence de tels événements ont été décrites dans le traitement de cancers gastriques en phase II (24). Il semblerait cependant que ces augmentations soit plus le fait de l'association de cet anti-VEGF à une polychimiothérapie que de l'anti-VEGF seul. Ces effets indésirables thrombotiques seraient non pas dépendants du bevacizumab seul mais du type de cancer et du type de polychimiothérapie associée au bevacizumab. Des polychimiothérapies associées au bevacizumab dans le traitement du cancer du sein ou du poumons à petites cellules n'ont pas eu d'effets de ce type (24).

Les événements thrombotiques constatés sont essentiellement des événements thromboemboliques veineux (E TEV) mais les événements thromboemboliques artériels (E TEA) ne sont pas rares. La FDA dans son « Avastin labelling texte » de 2007 (<http://4>) recommande de prescrire le bevacizumab avec précaution au cours des 28 jours suivant une chirurgie majeure, chez les patients présentant :

- un maladie cardiovasculaire importante,
- un antécédent d'E TEA et âgés de plus de 65ans
- un antécédent d'accident ischémique transitoire ou d'angine de poitrine
- des cas d'hémoptysies récentes
- des métastases au niveau du système nerveux central.

L'industriel Genentech, quant à lui, recommande une prescription discontinue du bevacizumab pour les patients qui développent des E TEA ou de significatives hémorragies au cours de leur traitement par le bevacizumab.

#### ◆ *VEGF-Trap*

VEGF-Trap résulte de la fusion du domaine extracellulaire du VEGFR-2 à un fragment Fc d'immunoglobuline humaine. Il est en phase I des essais cliniques en association avec des cytotoxiques dans le traitement du cancer colorectal. A notre connaissance, pas de saignements ou de complications thrombotiques n'a été observé.

#### **D.2.1.2 Inhibiteurs de Tyrosine Kinase (TKIs)**

Une autre stratégie d'inhibition de la voie de signalisation VEGF/VEGFR est d'inhiber les récepteurs VEGFR en ciblant leur domaine tyrosine kinase intracellulaire.

Les inhibiteurs des tyrosines kinase (TKIs) en développement ne sont pas strictement spécifiques des VEGFR et interfèrent souvent avec d'autres récepteurs tyrosine kinase impliqués dans l'angiogenèse comme le PDGFR et l'EGFR. L'effet anti-angiogénique des TKIs est similaire aux anti-VEGF puisqu'ils inhibent la signalisation VEGF/VEGFR. Cependant, leur action sur d'autres récepteurs tyrosine kinase leur permet d'affecter aussi la cellule tumorale et les cellules du stroma tumoral en fonction des récepteurs tyrosine kinase qu'elles expriment. Une activité anti-angiogénique est donc associée à une activité antinéoplasique directe.

#### ◆ *Sorafenib*

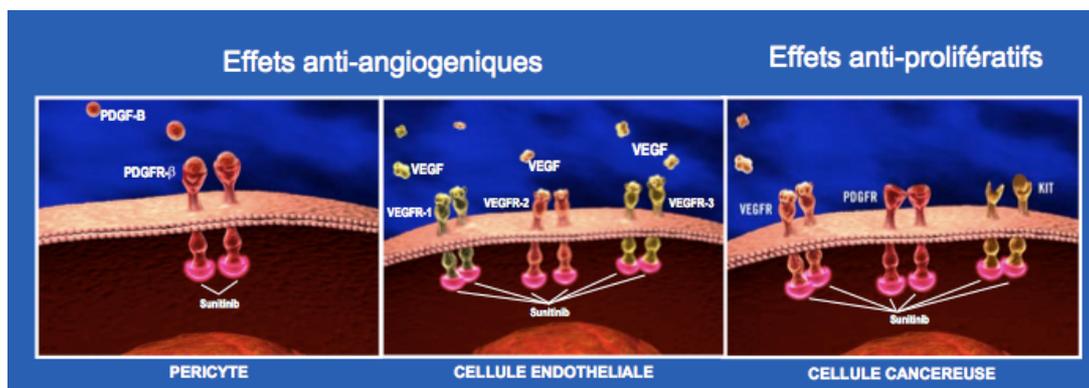
Le sorafenib (NEXAVAR®) ou BAY 43-9006 est un inhibiteur de tyrosine kinase qui cible la Raf kinase intracellulaire ainsi que le domaine tyrosine kinase intracellulaire des VEGFR-2 et -3, PDGFR- $\beta$ , cKit et FLT3.

Le Sorafenib a été approuvé par la FDA en décembre 2005 pour le traitement des carcinomes rénaux métastasés et a reçu son AMM en juillet 2006 pour le traitement du carcinome rénal avancé après échec d'un traitement préalable. Les effets indésirables vasculaires observés sont une hypertension, des hémorragies et des cas d'infarctus du myocarde ( 23, 50, 111)

#### ◆ *Sunitinib*

Le Sunitinib (SUTENT®) ou SU11248 est un inhibiteur de tyrosine kinase pour des récepteurs VEGFR-1, -2, et 3, PDGFR-b, FLT-3, CSF-1R et RET. Il a été approuvé par la FDA en janvier 2006 pour la même indication que le sorafenib avec en plus une indication

pour les GIST (gastrointestinal stromal tumors) résistants à l'imatinib (Glivec®). Il a obtenu sa première AMM européenne en septembre 2006 pour ces mêmes indications.



**Figure 57 : Mécanisme d'action du sunitinib**

Au cours de deux essais de phase II, pour le carcinome du rein métastasé, 3 patients ont fait un épisode d'ischémie cardiaque de grade 3 et un patient est décédé d'un infarctus du myocarde. Cet IDM serait imputable à un ETEA. Dans une autre étude de phase II, 3% des patients traités par le sunitinib pour un GIST montrent de sévères hémorragies alors qu'aucune hémorragie n'est constatée en absence du TKIs ( 23, 50, 111).

#### ◆ *Autres TKIs*

Le nombre de TKIs en développement clinique est très important. Parmi eux, certains montrent des événements thrombotiques comme des embolies pulmonaires et des ETEV. C'est le cas du ZD6474 (phase II), vatalanib (phase I, II, et III), pazopanib, ZD2171 (phase I), PD173074, CHIR-258, et KRN951 ( 24, 111).

#### **D.2.1.3 Mécanismes thrombotiques induits par l'inhibition de la signalisation VEGF/VEGFR.**

La physiopathologie de ces événements thrombotiques n'est pas claire à ce jour. Cependant, la connaissance du rôle physiologique du VEGF permet de proposer quelques explications logiques à ces événements (figure 58).

Le VEGF a un rôle reconnu dans l'entretien et le maintien d'une vascularisation saine, indépendamment de l'angiogenèse. Ainsi l'inhibition de la signalisation VEGF/VEGFR induirait l'apoptose des cellules endothéliales. Cette apoptose non orchestrée provoquerait des hémorragies au sein des tumeurs et mènerait à l'exposition du sous-endothélium pro-thrombotique (24, 111).

Par ailleurs, le VEGF induit la synthèse des prostacyclines et du NO, inhibiteurs de l'aggrégation plaquettaire et vasodilatateurs.

Le VEGF serait aussi capable de réguler la balance entre les facteurs procoagulants et anticoagulants produits par la cellule endothéliale normale. Un excès de VEGF induit le phénotype aberrant de la cellule endothéliale tumorale avec production excessive de facteur von Willebrand (vWF), de facteur tissulaire (FT), d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1), de facteur d'activation plaquettaire (PAF), de thromboxane A2 et une baisse de production de tPA, de récepteur de la protéine C, de thrombomoduline ainsi que d'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) ... Dans ce terrain tumoral procoagulant, l'inhibition brutale du VEGF mène

- à l'apoptose de cellules endothéliales riches en facteur tissulaire à leur surface, libérant des microparticules avec le FT sur leur membrane

- à l'arrêt de production des prostacyclines et du NO

- à l'activation des plaquettes

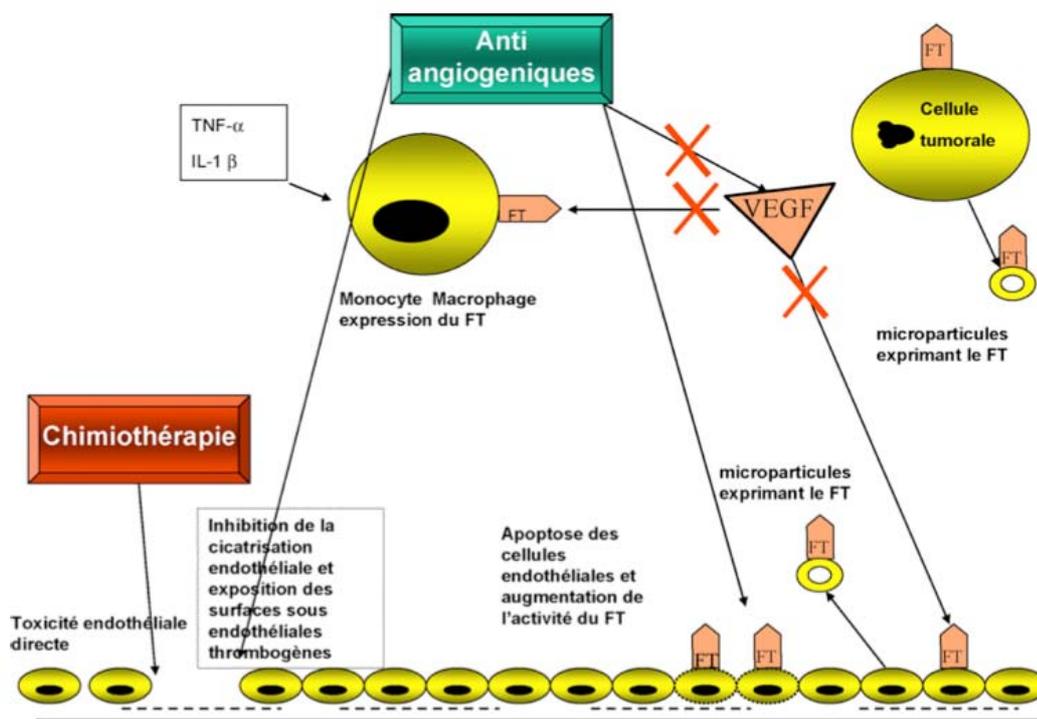
et par conséquent apporte les conditions adéquates à l'arrivée d'un événement thrombotique majeur (23, 24, 111).

Ces événements thrombotiques seraient donc la conséquence d'une interruption brutale de la signalisation VEGF/VEGFR à la fois au sein de la tumeur et dans certaines régions de l'organisme.

Dans le cas des TKIs, la voie VEGF/VEGFR n'est pas la seule ciblée, les TKIs ont de nombreuses cibles différentes sur divers types cellulaires avec des affinités variables. Le risque d'évènements thrombotiques serait de ce fait difficile à apprécier. Une toxicité cardiaque a été décrite pour le sorafenib et le sunitinib. Pour ce dernier, un cas de microangiopathie thrombotique a été observé (47).

Associé à la chimiothérapie, le risque d'apparition de ces événements thrombotiques est augmenté par le fait que la chimiothérapie elle-même serait impliquée dans la survenue de thrombose veineuse profonde. La chimiothérapie peut induire des lésions de l'endothélium vasculaire avec libération des facteurs procoagulants dont le facteur tissulaire, des modifications de la concentration en cofacteurs comme une augmentation du vWF, une diminution de l'ATIII, un déficit en facteur V, en protéines S et C ...

Ces événements thromboemboliques semblent être un effet de la classe des inhibiteurs de la signalisation VEGF/VEGFR.



**Figure 58 : Effets prothrombotiques des molécules thérapeutiques anti-angiogéniques.**  
(tiré de Drouet et al, 2008)

## **D.2.2 Analogues des inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse**

L'endostatine et l'angiostatine sont deux puissants inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse par action directe sur la cellule endothéliale (figure 56). Ils résultent respectivement du clivage du collagène XVIII de la membrane basale et du plasminogène.

Des molécules recombinantes de chacun de ces inhibiteurs ont été développées et sont actuellement en essais cliniques. Leur action sur la cellule endothéliale tumorale serait à l'origine de certains événements thromboemboliques (23, 24, 111).

### **D.2.2.1 Endostatine recombinante humaine et mécanismes thrombotiques**

L'endostatine endogène a un puissant effet anti-angiogénique. Il interfère dans la signalisation VEGF/VEGFR en interagissant avec le récepteur VEGFR-2. Il se fixe également à la surface des cellules endothéliales sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  pour diminuer l'activité des FAK (focal adhesion kinase) intracellulaires et par conséquent l'activité de la voie Ras/Raf qui permet la migration des cellules endothéliales (figure 56).

Chez l'humain, l'endostatine recombinante humaine n'a pas eu d'effet anti-néoplasique en monothérapie. Par contre, dans une étude de phase II pour le traitement de tumeurs neuroendocrines, 2% des patients présentent des hémorragies de grade 3 associées ou non à des infarctus du myocarde de grade 4. (24, 111).

La physiopathologie susceptible d'expliquer ces manifestations est l'inhibition de la voie de signalisation VEGF/VEGFR comme décrit ci-dessus avec l'apoptose des cellules endothéliales. Parallèlement, l'apoptose peut être induite par la fixation du recombinant sur l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  inhibant ainsi la cascade de signalisation FAK/Ras/Raf/MEK/ERK assurant la survie de la cellule endothéliale.

Cette apoptose massive non physiologique des cellules endothéliales induit des hémorragies et l'exposition de la membrane basale thrombogène aux acteurs de l'hémostase et donc des événements thrombotiques.

#### **D.2.2.2 Angiostatine recombinante humaine et mécanismes thrombotiques**

L'angiostatine, obtenue par clivage du plasminogène, est également un puissant agent anti-angiogénique. Il inhibe les activateurs du plasminogène (tPA et uPA), ce qui induit une baisse de production de plasmine indispensable à l'activation des métalloprotéases matricielles MMPs.

Il agit également par inhibition de l'activité de l'annexine II. L'annexine II est un récepteur protéique transmembranaire endothélial fixant le calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Son domaine intracellulaire sert de substrat à la protéine kinase C (PKC) et à la Src tyrosine kinase. L'angiostatine, en se liant à ce récepteur, induit une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire et l'arrêt de la signalisation FAK dépendante impliquée dans la survie des cellules endothéliales (24, 111).

Chez des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules, une étude de phase II associant angiostatine-paclitaxel et carboplatine a montré l'efficacité de l'angiostatine. Cependant, l'angiostatine a montré des effets indésirables tels que des accidents ischémiques transitoires pour 4% des patients et des embolies pulmonaires pour 9%.

Ces pathologies thrombotiques s'expliqueraient par l'hypercoagulabilité induite par l'inhibition de la fibrinolyse via l'inhibition du tPA et également par l'apoptose des cellules endothéliales via l'inhibition de la cascade de signalisation en aval de FAK impliquée dans la survie cellulaire.

### **D.2.3 Immunomodulateurs à activité anti-angiogénique**

L'activité anti-angiogénique des immunomodulateurs serait secondaire à l'inhibition de la sécrétion du VEGF et du b-FGF par les cellules tumorales et les cellules stromales (fibroblastes, cellules immunitaires) (24).

Le plus connu des immunomodulateurs est la thalidomide suivie de ses analogues le lenalidomide, le revlimid et l'actimid appelé IMiDs (pour immunomodulatory derivatives). *In vitro*, ces analogues ont montré une activité anti-angiogénique 100 fois supérieure à celle de la thalidomide qui pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des intégrines angiogéniques avec inhibition de la migration et de l'adhésion endothéliale.

L'activité anti-angiogénique de ces immunomodulateurs est importante dans le traitement des hémopathies malignes comme le myélome multiple. Certains sont également en essais cliniques pour le traitement d'autres hémopathies malignes comme les syndromes myélodysplasiques, les macroglobulinémies de Waldenström, certaines leucémies aigües...ainsi que pour le traitement de certaines tumeurs solides comme le mélanome, le cancer du rein, de la prostate...

La thalidomide et ses analogues présentent une augmentation importante du risque de survenue d'événements thrombo-emboliques qu'il est important de comprendre.

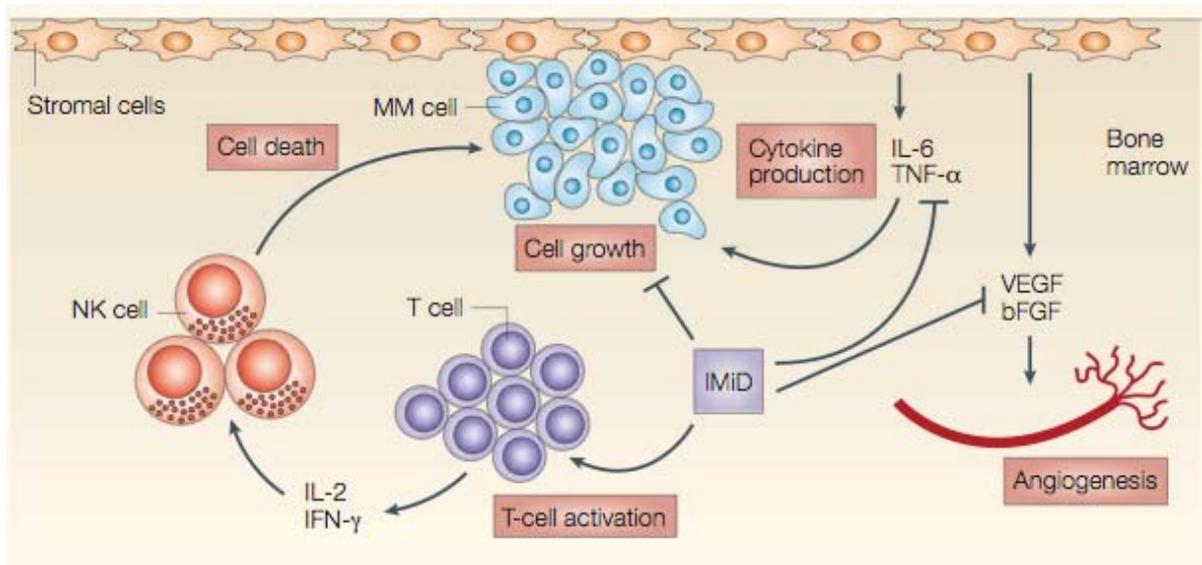
#### **D.2.3.1 Thalidomide**

La thalidomide est un dérivé synthétique de l'acide glutamique, immunomodulateur et à forte activité anti-angiogénique. Il apporte un bénéfice clinique certain dans le traitement des formes réfractaires du myélome multiple ou des rechutes. Il a été approuvé par la FDA en mai 2006 pour la prise en charge du myélome en association avec la dexaméthasone. En France, il est soumis à une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU).

Le mécanisme d'action de la thalidomide est complexe (figure 59). L'étude de Vacca et coll (110, 109) a précisé que la thalidomide agirait, uniquement dans le cas d'un myélome multiple actif, sur les cellules endothéliales de la moelle osseuse en exerçant un rétro-contrôle négatif dose-dépendant sur l'expression de gènes pro-angiogéniques tels que, dans l'ordre d'effet décroissant, b-FGF>VEGF > IGF-1> HGF> Angiopoïétine-2.

Par ailleurs, la thalidomide inhibe l'expression et la libération du TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 à la fois par les cellules cancéreuses et par les cellules stromales (monocytes, fibroblastes) de la moelle osseuse. Elle stimule l'activité immunitaire cellulaire de l'hôte (lymphocytes T et NK

avec production d'IL-2 et IFN- $\gamma$ ) et l'apoptose des cellules cancéreuses. Par ailleurs, elle réduit l'adhésion et l'interaction des cellules cancéreuses avec les cellules stromales de la moelle osseuse (6, 53, 54, 88, 107, 110).



**Figure 59 : Mécanismes d'actions de la Thalidomide et ses analogues dans le myélome multiple.**  
(tiré de Bartlett et al, 2004)

Les événements thromboemboliques veineux (ETEVE) mais également artériels (ETEVA) (à un moindre niveau cependant) représentent la toxicité vasculaire majeure de la thalidomide (4).

Dans l'indication du myélome multiple nouvellement diagnostiqué, et donc non traité, basé sur l'étude en phase III, des essais cliniques montrent l'amélioration des réponses dans le bras thalidomide + dexaméthasone versus le bras dexaméthasone seul.

Si le pourcentage d'ETEVE trouvé chez les patients traités avec la thalidomide seule n'est pas significativement différent de celui observé chez les patients non traités, il n'en est pas de même dans le cas du carcinome rénal où l'administration de la thalidomide en monothérapie a montré au cours d'un essai clinique que 23% des malades ont présenté une ETEVE (24, 111).

En cas de bithérapie, chez les patients atteints d'un myélome multiple, le taux d'ETEVE est dramatiquement augmenté avec la dexaméthasone à haute dose ou avec la doxorubicine. Il en est de même avec le docetaxel chez les patients atteints d'un cancer de la prostate.

Une étude menée sur des patients souffrant de syndrome myélodysplasique a montré que l'association thalidomide-darbepoïétine alpha présentait un risque majeur et l'étude a du être stoppée après une TVP chez trois patients dont l'un est décédé par embolie pulmonaire (39).

### **D.2.3.2 IMiDs: Lenalidomide et Actimid**

#### **◆ Lenalidomide**

Le lenalidomide a été approuvé dans le traitement du myélome multiple réfractaire ou en rechute en juin 2006 par la FDA par le fait que l'association lenalidomide-dexaméthasone était plus efficace que la dexaméthasone seule. Il a obtenu récemment une AMM en Europe.

Le lenalidomide est moins toxique mais un plus puissant immunomodulateur que la thalidomide si l'on regarde l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 ainsi que le taux de réponse des myélomes multiples traités. Il stimule 50 à 2000 fois plus la prolifération des lymphocytes T et induit une production d'IL-2 et INF- $\gamma$  50 à 100 fois supérieur. (39)

Du point de vue des effets indésirables vasculaires, le lenalidomide n'offre pas de garantie supplémentaire par rapport à la thalidomide (39, 64). Comme la thalidomide, l'incidence de TVP dans le cas d'un traitement seul est de 2 à 4%, et en association avec la dexaméthasone, il augmente la fréquence d'événements thromboemboliques veineux de 4,5 % avec la dexaméthasone seule à 8,5%. Un traitement parallèle à l'EPO recombinante élève encore ce risque de survenue d'événements thromboemboliques (111)

#### **◆ Actimid (CC-4047)**

L'actimid, en essai clinique de phase I, présente également une toxicité moindre pour une activité majorée comparée à la thalidomide. Dans une étude de phase I pour le traitement du myélome multiple réfractaire ou en rechute, le taux de réponse est de 67% mais associé à un taux de thrombose veineuse profonde de 12,5%.

La baisse de toxicité de cet analogue comme le lenalidomide n'influence pas le risque de survenue des événements thromboemboliques.

### **D.2.3.3 Mécanismes thrombotiques de la thalidomide et des IMiDs**

Les événements thromboemboliques induits par la thalidomide ou les IMiDs sont essentiellement des TVP avec ou sans embolie pulmonaire.

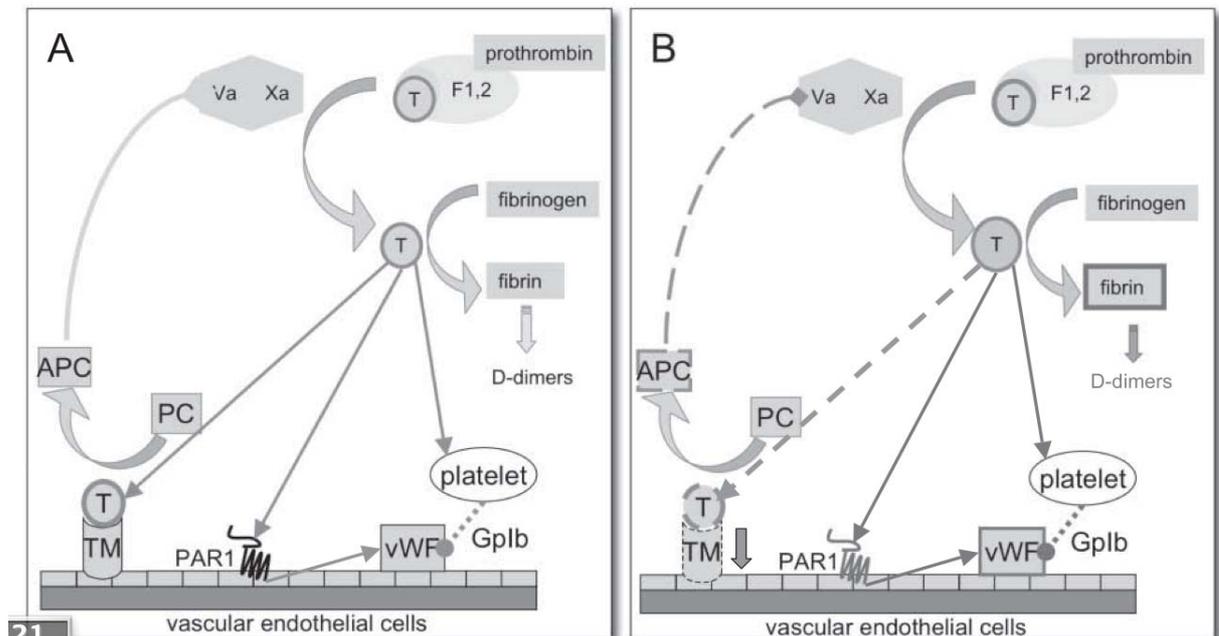
La thalidomide ou ses analogues, en association avec la dexaméthasone à haute dose, la doxorubicine et les facteurs de croissance érythropoïétiques induit un effet pro-thrombotique systémique de longue durée.

Cet effet prothrombotique serait dû au blocage d'une des voies d'inhibition de la thrombine (figure 60).

Comme nous l'avons décrit, la thrombine est très présente dans le pathologie cancéreuse par le fait de son activité pro-angiogénique. Dans l'induction des événements thromboemboliques chez les patients cancéreux, elle fait partie des facteurs de risques importants. L'inhibition physiologique de la thrombine se fait soit par l'action de l'antithrombine soit par l'action de la thrombomoduline.

Le dosage de l'antithrombine chez les patients traités avec l'association thalidomide-dexaméthasone n'a révélé aucune modification de la concentration plasmatique en antithrombine comparé aux patients traités uniquement avec la dexaméthasone.

La thrombomoduline (TM) est physiologiquement enchassée dans la membrane endothéliale face luminale afin de capter la thrombine dans le sang, de rendre son activité pro-coagulante inactive et de lui permettre ainsi d'activer la protéine C. Cependant, il existe aussi une forme soluble, physiologique, dans la circulation capable d'inactiver la thrombine. Chez les patients traités par l'association thalidomide et dexaméthasone, la concentration plasmatique en TM soluble est significativement diminuée de plus de moitié en quelques mois (39) augmentant ainsi progressivement la quantité de thrombine active disponible.



**Figure 60 : Mécanismes moléculaires expliquant l'état pro-thrombotique des patients traités par la thalidomide.**

Baisse de la thrombomoduline circulante, surexpression des PAR-1, excès de FvW libérés par les cellules endothéliales (Tiré de Gieseler et al, 2008)

Par ailleurs, le nombre de cellules endothéliales exprimant les PAR-1 (protéase-activated receptor) à leur surface a été décrit très augmenté chez les patients traités par l'association

thalidomide-doxorubicine comparé à la doxorubicine seule. Comme nous l'avons expliqué dans l'angiogenèse tumorale, par action sur les PAR-1, la thrombine favorise l'expression du facteur tissulaire à la surface de la cellule endothéliale mais également la libération du facteur von Willebrand des corps de Weibel-Palade. Si la thrombine disponible et l'expression de son récepteur PAR-1 augmentent parallèlement, une expression accrue du facteur tissulaire et la libération élevée de facteur von Willebrand devraient être constatées. Un risque thrombotique élevé devrait y être associé. Les patients traités par la thalidomide montrent en effet un taux très augmenté de l'antigène du vWF (374%) et ce taux est très supérieur chez les patients faisant un épisode de TVP par rapport aux autres (39).

Ainsi durant les premiers mois de traitement avec la thalidomide, il a été constaté une diminution de la concentration plasmatique en thrombomoduline, une augmentation de l'expression des PAR-1 endothéliales et une augmentation de la concentration en vWF sur les plaquettes provoquant une augmentation de l'agrégation plaquettaire.

Cet état prothrombotique est renforcé par d'autres agents prothrombotiques comme la dexaméthasone à haute dose, la doxorubicine et les facteurs de croissance érythropoïétiques. Ces associations peuvent devenir fatales pour les patients en absence de toute prophylaxie antithrombotique (39).

Les chimiothérapies cytotoxiques augmentent encore le potentiel thrombotique de la thalidomide et des IMiDs

-en induisant des dommages endothéliaux que ne provoquent pas d'eux même la thalidomide et les IMiDs et

-en induisant la transcription de kinases inductibles par les glucocorticoïdes, c'est le cas de la dexaméthasone en monothérapie, nécessaire à l'expression de molécules procoagulantes telles que le facteur tissulaire, le PAI-1 et la thrombine .

L'érythropoïétine recombinante potentialiserait ce risque d'événements thromboemboliques en augmentant le niveau de la protéine C réactive et de l'inhibiteur de la fibrinolyse activé par la thrombine (TAFI) (36, 39).

#### **D.2.4 Autres antiangiogéniques**

Les autres anti-angiogéniques comme les TKIs ciblant les récepteurs EGFR (cetuximab), HER-2 (herceptin)..., ou encore l'imatinib (ciblant PDGFR avec plus d'affinité que bcr/abl)(55), ne présentent pas ces effets indésirables sans doute par le fait qu'ils n'agissent

pas directement sur les cellules endothéliales mais agissent sur l'expression du VEGF par les cellules tumorales et induisent une diminution progressive de celle-ci sans apoptose massive des cellules endothéliales.

#### **D.2.5 VDAs (vascular disrupting agents)**

D'autres molécules agissent sur la vascularisation tumorale, ce sont les VDAs (vascular disrupting agents). Ils diffèrent des inhibiteurs de l'angiogenèse par le fait qu'ils n'inhibent pas la formation de nouveaux vaisseaux mais ciblent des composants des vaisseaux existants pour les détruire ou activent le TNF- $\alpha$ . Les trois classes principales sont les agents fixant la tubuline des cellules endothéliales, les antagonistes des N-cadherines et les activateurs du TNF- $\alpha$ . Dans tous les cas, ils induisent l'apoptose des cellules endothéliales et il est constaté des événements vasculaires avec chacun d'eux comme des ischémies cardiaques, des phlébites, des embolies pulmonaires, des HTA (111).

Ces événements confirment que les thérapies qui ciblent la cellule endothéliale tumorale directement présentent un risque accru de survenue d'événements vasculaires de type thromboembolique comparés aux autres cibles anti-angiogéniques.

## **CONCLUSION**

La pathologie thrombotique fait partie intégrante de la prise en charge des patients atteints d'un cancer surtout s'ils sont traités par les anti-angiogéniques.

La pathologie cancéreuse est à elle seule un facteur de risque de survenue d'événements thromboemboliques majeur compte-tenu de sa physiopathologie angiogénique.

L'utilisation de thérapies anti-angiogéniques comme le bevacizumab, l'angiostatine, l'endostatine ou la thalidomide et ses analogues constitue un facteur de risque supplémentaire important. Ces agents agissent en induisant l'apoptose des cellules endothéliales tumorales, en exposant ainsi le sous-endothélium thrombogène, en activant les plaquettes, et en inhibant la fibrinolyse. D'autres agents induisent secondairement l'augmentation du facteur tissulaire, de la thrombine et du vWF.

L'efficacité de ces thérapies anti-angiogéniques se révèle être meilleure en association à une chimiothérapie cytotoxique ou avec la dexaméthasone qui d'elles mêmes favorisent un état thrombotique en lésant les cellules endothéliales ou en favorisant l'expression de facteurs procoagulants.

Ainsi le développement de nouvelles associations peut amener à exposer le patient dans certains cas à une synergie prothrombogène et des accidents thrombotiques peuvent être constatés jusqu'à 40% des cas (24, 111)

Les facteurs de croissance représentent également un facteur de risque supplémentaire à ne pas négliger.

Dans ce contexte, une prophylaxie des événements thrombo-emboliques est à envisager. La connaissance des différents mécanismes thrombotiques de chacun des facteurs de risque permet de prescrire le traitement anti-thrombotique le plus approprié entre l'aspirine, les héparines de bas poids moléculaires (nadroparine et enoxaparine) et les anti-vitamines K (Warfarine).

L'utilisation des HBPM pourrait avoir un double effet puisqu'il a été démontré dans des études préclinique que les HBPM (daltéparine et enoxaparine) avaient une activité anti-angiogénique (68, 69, 62, 90, 114). Ces HBPM sont démontrées efficaces par leur action sur la thrombine et par leur capacité à fixer comme HSPG, les protéines fixant l'héparine tels que les facteurs de croissance pro-angiogéniques VEGF, b-FGF.... La protection qu'elle offre parallèlement contre l'état prothrombotique (lui aussi associé à présence de la thrombine) font de cette molécule, une molécule d'avenir dans le traitement des cancers.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jun;8(6):464-78.
2. Ahn GO, Brown JM. Matrix metalloproteinase-9 is required for tumor vasculogenesis but not for angiogenesis: role of bone marrow-derived myelomonocytic cells. *Cancer Cell.* 2008 Mar;13(3):193-205.
3. Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 2005 Dec 15;438(7070):946-53.
4. Alkindi S, Dennison D, Pathare A. Arterial and venous thrombotic complications with thalidomide in multiple myeloma. *Arch Med Res.* 2008 Feb;39(2):257-8.
5. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2005 Apr;54(1):53-61.
6. Bartlett JB, Dredge K, Dalglish AG. The evolution of thalidomide and its IMiD derivatives as anticancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2004 Apr;4(4):314-22.
7. Beaudeau J.-L., Giral P., Bruckert E., Foglietti M.-J., Chapman M.J., Métalloprotéases matricielles et athérosclérose. Perspectives thérapeutiques, *Annales de Biologie Clinique*, 2003 mars-Apr : 61(2) : 147-58.
8. Berrier AL, Yamada KM. Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol.* 2007 Dec;213(3):565-73.
9. Bikfalvi A. Le rôle du facteur plaquettaire 4 dans la régulation et l'inhibition de l'angiogénèse. *Hématologie.* 2004 sept-oct ; 5(10) : 365-9.
10. Bikfalvi A., Javerzat S., Perollet C., Savona C. Angiogénèse et cancer. *Bull. Cancer.* 1997 Sept ; 84 (9) : 885-90.
11. Brindle NP, Saharinen P, Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res.* 2006 Apr 28;98(8):1014-23.
12. Brower V. Tumor angiogenesis--new drugs on the block. *Nat Biotechnol.* 1999 Oct;17(10):963-8.
13. Cao R, Eriksson A, Kubo H, Alitalo K, Cao Y, Thyberg J. Comparative evaluation of FGF-2-, VEGF-A-, and VEGF-C-induced angiogenesis, lymphangiogenesis, vascular fenestrations, and permeability. *Circ Res.* 2004 Mar 19;94(5):664-70.
14. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):653-60.
15. Chantrain C, DeClerck YA. Les métalloprotéases matricielles et les inhibiteurs synthétiques dans la progression tumorale. *M/S*, 2002, 18 : 565-75.
16. Christopher J. Schofield & Peter J. Ratcliffe. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004 May ; 5, 343-354.
17. Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):661-8.
18. Clottes E. Hypoxia-inducible factor 1: regulation, involvement in carcinogenesis and target for anticancer therapy. *Bull Cancer.* 2005 Feb;92(2):119-27.
19. Couffinhal T, Dufourcq P, Daret D, Duplaà C. Les mécanismes de l'angiogénèse. Applications médicales et thérapeutiques. *Rev Méd Interne.* 2001, 22:1064-82.
20. Daubie V, Pochet R, Houard S, Philippart P. Tissue factor: a mini-review. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 May-Jun;1(3):161-9.

21. De Boüard S, Guillamo JS. Angiogenesis and anti-angiogenic strategies for glioblastoma. *Bull Cancer*. 2005 Apr;92(4):360-72.
22. Delmas Y, Viillard JF, Villeneuve J, Grosset C, Pasquet JM, Dechanet-merville J, Nurden P, Pellegrin JL, Rosenbaum J, Combe C, Nurden AT, Ripoché J. Le CD154 plaquettaire. Une nouvelle interface dans l'hémostase et la réaction inflammatoire. *M/S*, 2005, Oct. 21(10):825-31.
23. Desauw C, Bonnetterre J. Antineoplastic treatment and venous thrombosis. *Bull Cancer*. 2006 Feb 1;93(2):171-8.
24. Drouet L. Thromboembolic risk associated with use of angiogenesis inhibitors used for the treatment of cancers. *Pathol Biol (Paris)*. 2008 Jun;56(4):195-204.
25. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, Song H, Vandenberg S, Johnson RS, Werb Z, Bergers G. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell*. 2008 Mar;13(3):206-20.
26. Edwards DR, Murphy G. Cancer. Proteases--invasion and more. *Nature*. 1998 Aug 6;394(6693):527-8.
27. Eichhorn ME, Kleespies A, Angele MK, Jauch KW, Bruns CJ. Angiogenesis in cancer: molecular mechanisms, clinical impact. *Langenbecks Arch Surg*. 2007 May;392(3):371-9.
28. Eklund L, Olsen BR. Tie receptors and their angiopoietin ligands are context-dependent regulators of vascular remodeling. *Exp Cell Res*. 2006 Mar 10;312(5):630-41.
29. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Targeting angiogenesis in oncology. *Pathol Biol (Paris)*. 2006 May;54(4):199-205.
30. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070): 967-74.
31. Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis to tissue hypoxia. *Angiogenesis*. 2008;11(2):121-40.
32. Fribourg C, Denis CV. Plaquettes et tumeurs. *Hématologie*. 2006 ; 12(6) : 400-11.
33. Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HZ, Kodama T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol*. 2008 May;10(5):513-26.
34. Fukumura D, Jain RK. Tumor microvasculature and microenvironment: targets for anti-angiogenesis and normalization. *Microvasc Res*. 2007 Sep-Nov;74(2-3):72-84.
35. Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. Metalloproteinases and angiogenesis. *Pathol Biol (Paris)*. 2003 Apr;51(3):161-6.
36. Galli M, Elice F, Crippa C, Comotti B, Rodeghiero F, Barbui T. Recombinant human erythropoietin and the risk of thrombosis in patients receiving thalidomide for multiple myeloma. *Haematologica*. 2004 Sep;89(9):1141-2.
37. Gasparini G, Longo R, Fanelli M, Teicher BA. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 20;23(6):1295-311.
38. Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, Jeltsch M, Mitchell C, Alitalo K, Shima D, Betsholtz C. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol*. 2003 Jun 23;161(6):1163-77.

39. Gieseler F. Pathophysiological considerations to thrombophilia in the treatment of multiple myeloma with thalidomide and derivatives. *Thromb Haemost.* 2008 Jun;99(6):1001-7. Review. Erratum in: *Thromb Haemost.* 2008 Jul;100(1):171.
40. Helley D, Fischer AM. Le système de l'hémostase dans la modulation de l'angiogenèse. *Hématologie.* 2001 May-jun ; 3(7) : 184-91.
41. Heloterä H, Alitalo K. The VEGF family, the inside story. *Cell.* 2007 Aug 24;130(4):591-2.
42. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development.* 2003 Oct;130(20):4769-84.
43. Hu B, Guo P, Fang Q, Tao HQ, Wang D, Nagane M, Huang HJ, Gunji Y, Nishikawa R, Alitalo K, Cavenee WK, Cheng SY. Angiopoietin-2 induces human glioma invasion through the activation of matrix metalloprotease-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 22;100(15):8904-9.
44. Hubbard NE, Lim D, Mukutmoni M, Cai A, Erickson KL. Expression and regulation of murine macrophage angiopoietin-2. *Cell Immunol.* 2005 Apr;234(2):102-9.
45. Hynes RO. A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis. *Nat Med.* 2002 Sep;8(9):918-21.
46. Iivanainen E, Nelimarkka L, Elenius V, Heikkinen SM, Junttila TT, Sihombing L, Sundvall M, Maatta JA, Laine VJ, Yla-Herttuala S, Higashiyama S, Alitalo K, Elenius K. Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor. *FASEB J.* 2003 Sep;17(12):1609-21.
47. Izzedine H. [Angiogenesis inhibitor therapies: focus on hypertension and kidney toxicity]. *Bull Cancer.* 2007 Nov 1;94(11):981-6.
48. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003 Jun;9(6):685-93.
49. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):422-33.
50. Kamba T, McDonald DM. Mechanisms of adverse effects of anti-VEGF therapy for cancer. *Br J Cancer.* 2007 Jun 18;96(12):1788-95.
51. Kessler T, Fehrmann F, Bieker R, Berdel WE, Mesters RM. Vascular endothelial growth factor and its receptor as drug targets in hematological malignancies. *Curr Drug Targets.* 2007 Feb;8(2):257-68.
52. Kivivuori SM, Siitonen S, Porkka K, Vettenranta K, Alitalo R, Saarinen-Pihkala U. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 3 and Tie1 tyrosine kinase receptor on acute leukemia cells. *Pediatr Blood Cancer.* 2007 Apr;48(4):387-92.
53. Kumar S, Anderson KC. Drug insight: thalidomide as a treatment for multiple myeloma. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 May;2(5):262-70.
54. Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. *J Clin Oncol.* 2004 Jun 15;22(12):2477-88. Review. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2004 Jul 15;22(14):2973.
55. Legros L, Pages G. Effet anti-angiogénique de l'imatinib mésylate (Glivec®) dans les leucémies myéloïdes chroniques. *Hématologie.* 2004 nov-dec ; 6(10) : 464-7.
56. Li M, Jendrossek V, Belka C. The role of PDGF in radiation oncology. *Radiat Oncol.* 2007 Jan 11;2:5.

57. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun;26(2):281-90.
58. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol.* 2001 Feb 1;61(3):253-70.
59. Liersch R, Schliemann C, Bieker R, Hintelmann H, Buechner T, Berdel WE, Mesters RM. Expression of VEGF-C and its receptor VEGFR-3 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukaemia. *Leuk Res.* 2008 Jun;32(6):954-61.
60. López-Pedreira C, Barbarroja N, Dorado G, Siendones E, Velasco F. Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia.* 2006 Aug;20(8):1331-40.
61. Maffei R, Marasca R, Martinelli S, Castelli I, Santachiara R, Morandi E, Zucchini P, Fontana M, Giacobbi F, Silingardi P, Bonacorsi G, Temperani P, Masini L, Colacci AM, Serra R, Torelli G. Angiopoietin-2 expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: association with clinical outcome and immunoglobulin heavy-chain mutational status. *Leukemia.* 2007 Jun;21(6):1312-5.
62. Marchetti M, Vignoli A, Russo L, Balducci D, Pagnoncelli M, Barbui T, Falanga A. Endothelial capillary tube formation and cell proliferation induced by tumor cells are affected by low molecular weight heparins and unfractionated heparin. *Thromb Res.* 2008;121(5):637-45.
63. Mazar AP. The urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) as a target for the diagnosis and therapy of cancer. *Anticancer Drugs.* 2001 Jun;12(5):387-400.
64. Menon SP, Rajkumar SV, Lacy M, Falco P, Palumbo A. Thromboembolic events with lenalidomide-based therapy for multiple myeloma. *Cancer.* 2008 Apr 1;112(7):1522-8.
65. Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep.* 2008 Jan-Feb;60(1):75-84.
66. Millette E, Rauch BH, Kenagy RD, Daum G, Clowes AW. Platelet-derived growth factor-BB transactivates the fibroblast growth factor receptor to induce proliferation in human smooth muscle cells. *Trends Cardiovasc Med.* 2006 Jan;16(1):25-8.
67. Nilsson I, Rolny C, Wu Y, Pytowski B, Hicklin D, Alitalo K, Claesson-Welsh L, Wennström S. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in hypoxia-induced vascular development. *FASEB J.* 2004 Oct;18(13):1507-15.
68. Norrby K. 2.5 kDa and 5.0 kDa heparin fragments specifically inhibit microvessel sprouting and network formation in VEGF165-mediated mammalian angiogenesis. *Int J Exp Pathol.* 2000 Jun;81(3):191-8.
69. Norrby K. Low-molecular-weight heparins and angiogenesis. *APMIS.* 2006 Feb;114(2):79-102.
70. Nyberg P, Salo T, Kalluri R. Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front Biosci.* 2008 May 1;13:6537-53.
71. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):3967-79.
72. Pavic M, Debourdeau P, Aletti M, Farge-Bancel D, Rousset H. Venous thromboembolism and cancer. *Rev Med Interne.* 2006 Apr;27(4):313-22.
73. Pepper MS. Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *M/S,* 2000, 16 : 1378-86.

74. Petralia GA, Lemoine NR, Kakkar AK. Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005 Jul;2(7):356-63.
75. Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res*. 1999 Nov 25;253(1):117-30.
76. Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*. 2008 Jan 29;5(1):e19.
77. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1383-95.
78. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):437-43.
79. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005 Apr;16(2):159-78.
80. Rafii DC, Psaila B, Butler J, Jin DK, Lyden D. Regulation of vasculogenesis by platelet-mediated recruitment of bone marrow-derived cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 Feb;28(2):217-22.
81. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):826-35.
82. Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood*. 2004 Oct 1;104(7):2084-6.
83. Rak J, Klement P, Yu J. Genetic determinants of cancer coagulopathy, angiogenesis and disease progression. *Vnitr Lek*. 2006 Mar;52 Suppl 1:135-8.
84. Rak J, Milsom C, May L, Klement P, Yu J. Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost*. 2006 Feb;32(1):54-70.
85. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2000 Dec;5(1):24-33..
86. Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *BBA*, 2006 ; 1765 : 178-88.
87. Ribatti D, Nico B, Vacca A. Importance of the bone marrow microenvironment in inducing the angiogenic response in multiple myeloma. *Oncogene*. 2006 Jul 20;25(31):4257-66.
88. Richardson P, Schlossman R, Jagannath S, Alsina M, Desikan R, Blood E, Weller E, Mitsiades C, Hideshima T, Davies F, Doss D, Freeman A, Bosch J, Patin J, Knight R, Zeldis J, Dalton W, Anderson K. Thalidomide for patients with relapsed multiple myeloma after high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: results of an open-label multicenter phase 2 study of efficacy, toxicity, and biological activity. *Mayo Clin Proc*. 2004 Jul;79(7):875-82.
89. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):58S-68S.
90. Robins HI, O'Neill A, Gilbert M, Olsen M, Sapiente R, Berkey B, Mehta M. Effect of dalteparin and radiation on survival and thromboembolic events in glioblastoma multiforme: a phase II ECOG trial. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008 Jul;62(2):227-33.

91. Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev.* 2007 Oct 15;21(20):2511-24.
92. Rüegg C. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *J Leukoc Biol.* 2006 Oct;80(4):682-4.
93. Ruf W. Redundant signaling of tissue factor and thrombin in cancer progression. *J Thromb Haemost.* 2007 Aug;5(8):1584-7.
94. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2005 Apr-Jun;9(2):267-85.
95. Saharinen P, Eklund L, Miettinen J, Wirkkala R, Anisimov A, Winderlich M, Nottebaum A, Vestweber D, Deutsch U, Koh GY, Olsen BR, Alitalo K. Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):527-37.
96. Sato M, Arap W, Pasqualini R. Molecular targets on blood vessels for cancer therapies in clinical trials. *Oncology (Williston Park).* 2007 Oct;21(11):1346-52; discussion 1354-5, 1367, 1370 passim.
97. Schliemann C, Bieker R, Padro T, Kessler T, Hintelmann H, Buchner T, Berdel WE, Mesters RM. Expression of angiopoietins and their receptor Tie2 in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2006 Sep;91(9):1203-11.
98. Schliemann C, Bieker R, Thoennissen N, Gerss J, Liersch R, Kessler T, Büchner T, Berdel WE, Mesters RM. Circulating angiopoietin-2 is a strong prognostic factor in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2007 Sep;21(9):1901-6.
99. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis.* 2006;9(4):225-30; discussion 231.
100. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 2008 Apr 30;41(4):278-86.
101. Shim WS, Ho IA, Wong PE. Angiopoietin: a TIE(d) balance in tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res.* 2007 Jul;5(7):655-65.
102. Silvestre JS, Lévy BI. Role of matrix proteolysis in angiogenesis. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu.* 2002:23-32.
103. Tabruyn SP, Griffioen AW. Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 30;355(1):1-5.
104. Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, Waltari M, Hellström M, Schomber T, Peltonen R, Freitas C, Duarte A, Isoniemi H, Laakkonen P, Christofori G, Ylä-Herttuala S, Shibuya M, Pytowski B, Eichmann A, Betsholtz C, Alitalo K. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature.* 2008 Jul 31;454(7204):656-60.
105. Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its rôle under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond).* 2005 Sep;109(3):227-41.
106. ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):857-69.
107. Teo SK. Properties of Thalidomide and its Analogues: Implications for Anticancer Therapy. *AAPS Journal.* 2005; 07(01): E14-E19. DOI:

108. Uutela M, Wirzenius M, Paavonen K, Rajantie I, He Y, Karpanen T, Lohela M, Wiig H, Salven P, Pajusola K, Eriksson U, Alitalo K. PDGF-D induces macrophage recruitment, increased interstitial pressure, and blood vessel maturation during angiogenesis. *Blood*. 2004 Nov 15;104(10):3198-204.
109. Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia*. 2006 Feb;20(2):193-9.
110. Vacca A, Scavelli C, Montefusco V, Di Pietro G, Neri A, Mattioli M, Bicciato S, Nico B, Ribatti D, Dammacco F, Corradini P. Thalidomide downregulates angiogenic genes in bone marrow endothelial cells of patients with active multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005 Aug 10;23(23):5334-46.
111. Van Heeckeren WJ, Sanborn SL, Narayan A, Cooney MM, McCrae KR, Schmaier AH, Remick SC. Complications from vascular disrupting agents and angiogenesis inhibitors: aberrant control of hemostasis and thrombosis. *Curr Opin Hematol*. 2007 Sep;14(5):468-80.
112. Vandembunder B. Mécanismes moléculaires de l'angiogénèse. *Hématologie*. 1997 may-jun ;3(3) : 221-9.
113. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M, Petersen HH, Ahamed J, Felding-Habermann B, Takada Y, Mueller BM, Ruf W. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood*. 2008 Jan 1;111(1):190-9.
114. Vignoli A, Marchetti M, Balducci D, Barbui T, Falanga A. Differential effect of the low-molecular-weight heparin, dalteparin, and unfractionated heparin on microvascular endothelial cell hemostatic properties. *Haematologica*. 2006 Feb;91(2):207-14. Erratum in: *Haematologica*. 2006 May;91(5):620.
115. Vlodaysky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R. Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression. *Thromb Res*. 2007;120 Suppl 2:S112-20
116. Wickström SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin signaling and regulation of endothelial cell-matrix interactions. *Adv Cancer Res*. 2005;94:197-229.
117. Yu JL, May L, Lhotak V, Shahrzad S, Shirasawa S, Weitz JI, Coomber BL, Mackman N, Rak JW. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1734-41.
118. Zhang X, Lawler J. Thrombospondin-based antiangiogenic therapy. *Microvasc. Research*, 2007 ; 74 : 90-9.

**Références des sites internet consultés courant septembre 2008.**

- http:// 1 <http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/illuspage/icv/icv.htm> Cardiovascular system lecture.
- http:// 2 <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.5.6.html>. Peau et phanères.
- http:// 3 : <http://www.eurekah.com/chapter/3508>  
Holger Gerhardt, VEGF and Endothelial Guidance in Angiogenic Sprouting, in VEGF in Development, Edited by: Christiana Ruhrberg
- http:// 4 [http://www.fda.gov/Medwatch/SAFETY/2007/Avastin\\_PI\\_apr07.pdf](http://www.fda.gov/Medwatch/SAFETY/2007/Avastin_PI_apr07.pdf)  
Avastin labelling texte.
- http:// 5 <http://www.med.unibs.it/~airc/gfs.html>
- http:// 6 <http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/05950fbc-2df4-4d8e-b745-54c9453c00d7/ch01.html>

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 23 octobre 2008

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR  
EN PHARMACIE

présenté par Béatrice FAIVRE

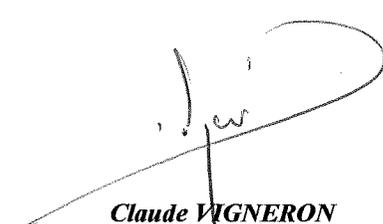
Sujet : Angiogenèse tumorale, thérapie anti-angiogénique et  
risque thrombotique : problème d'actualité.Jury :Président :,  
**Claude VIGNERON**, PU/PH Hématologie biologique, CHU-  
NancyJuges :  
**Pierre FEUGIER**, PU-PH Hématologie clinique, CHU-Nancy  
**Lionel GEOFFROIS**, PH, oncologue, Centre Alexis Vautrin  
**Jean Louis MERLIN**, PU Biologie cellulaire oncologique,  
attaché au Centre Alexis Vautrin.

Vu,

Nancy, le 23 septembre 2008

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

  
**Claude VIGNERON**

Professeur

Vu et approuvé,

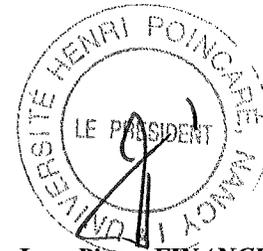
Nancy, le 26 SEP. 2008

Doyen de la Faculté de Pharmacie  
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,  
**Chantal FINANCE**

Vu,

Nancy, le 30.09.08

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

  
**Jean-Pierre FINANCE**

N° d'enregistrement : 3127



**TITRE**

**L'angiogenèse tumorale : thérapie anti-angiogénique et risque thrombotique, problème d'actualité.**

Thèse soutenue le 23 octobre 2008

Par Béatrice FAIVRE

**RESUME :**

La thérapie anti-angiogénique est en pleine émergence dans le traitement des cancers. Si les résultats sont prometteurs, cette thérapie n'est pas sans risque. Ce travail a pour objectif de montrer le terrain vasculaire sur lequel agit la thérapie anti-angiogénique dans le cas de pathologies cancéreuses et de comprendre les risques thrombotiques encourus.

Processus particulièrement complexe et important dans le développement de l'organisme (embryogenèse, croissance), l'angiogenèse n'intervient pratiquement plus dans les tissus adultes sains. Excepté lors de la réparation tissulaire, où son action est bénéfique, elle joue un rôle néfaste dans le développement des tumeurs (hémangiome, cancer) ou dans l'accompagnement de maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, ou encore dans la rétinopathie diabétique.

Comprendre l'implication de l'angiogenèse dans le développement tumoral cancéreux et les événements métastatiques nécessite d'exposer tout d'abord le principe et la mécanistique de l'angiogenèse physiologique pour ensuite présenter les différences mécanistiques de l'angiogenèse tumorale.

Dans le traitement du cancer, la thérapie anti-angiogénique est un pari stratégique et de nombreuses molécules sont en développement clinique. Cependant, la pathologie cancéreuse est un contexte clinique particulier eu égard aux risques de survenues d'évènements thromboemboliques et l'utilisation de cette thérapie anti-angiogénique peut aggraver ce risque. Pour comprendre cela, nous décrivons ce contexte clinique particulier et nous présentons pour les molécules anti-angiogéniques ayant donné lieu à des événements thromboemboliques, les mécanismes moléculaires mis en jeu et supposés responsables de ces événements.

**MOTS CLES :** Angiogenèse, cancer, thérapie anti-angiogénique, thromboses

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr. Claude VIGNERON	Hématologie-Physiologie-Biologie cellulaire oncologique EA 3452	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <b>3 et 5</b>

**Thèmes**

1 – Sciences fondamentales  
3 – Médicament  
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement  
4 – Alimentation – Nutrition  
6 – Pratique professionnelle