

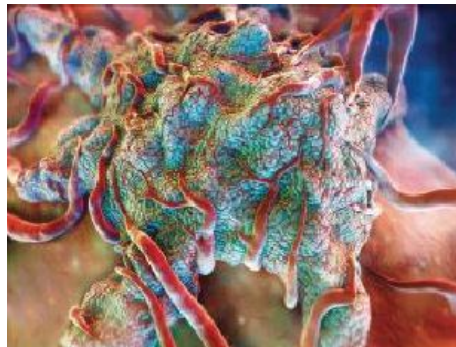
Mécanismes de l'angiogenèse

Présentation du Dr Stéphane Germain, Chercheur en biologie moléculaire, Directeur de Recherche à l'Inserm (Institut national de la santé et de la recherche médicale) - Collège de France - à l'occasion de la 7ème Rencontre Patients de l'Association A.R.Tu.R., le lundi 8 avril 2013 au Théâtre du Rond-Point à Paris.



I. Généralités

Les tumeurs solides sont très vascularisées, c'est à dire qu'elles contiennent de très nombreux vaisseaux. Ce phénomène avait déjà été observé par Hippocrate (considéré comme le père de la médecine) qui avait noté que les vaisseaux sanguins qui entourent une tumeur maligne ressemblent à des pattes de crabe. Il avait ainsi appelé cette maladie *karkinos* (carcinos, crabe en grec).



Le cancer du rein est caractérisé par une forte densité de vaisseaux sanguins.

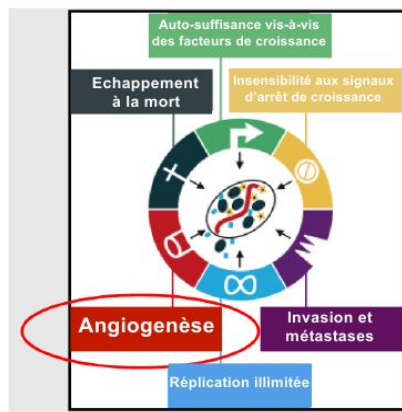
A) Les 6 propriétés élémentaires de la cellule tumorale :

Il existe un certain nombre de mécanismes qui conduisent à la prolifération tumorale et à la croissance des tumeurs. Ces événements concernent les cellules tumorales et le stroma qui est au contact de la tumeur, le stroma étant un tissu non tumoral nourricier et de soutien pour les cellules tumorales.

- ➔ Certains de ces mécanismes concernent la cellule tumorale elle-même qui doit :
- pouvoir échapper au contrôle de mort cellulaire programmée (immortalité) puisque son but est de proliférer,
 - être suffisante vis à vis de signaux qui entraînent la croissance des cellules,
 - être insensible aux signaux d'arrêt de croissance provenant du milieu extracellulaire,

- être capable d'envahir et métastaser lui donnant la capacité de s'échapper de son tissu d'origine,
 - avoir des capacités de réplication illimitée.
- ➔ D'autres sont liés à des interactions entre les cellules tumorales et le stroma, ces interactions jouant un rôle important dans les phénomènes d'invasion et de dissémination tumorales. C'est le cas de l'angiogenèse qui est une des 6 propriétés cellulaires essentielles conduisant au développement tumoral.

7^e Rencontre Patients de l'Association A.R.Tu.R.



L'angiogenèse est 1 des 6 « propriétés » cellulaires conduisant au développement tumoral



Cell. 2000 Jan 7;100(1):57-70

B) Définition de l'angiogenèse

L'angiogenèse, du grec *angeion* (vaisseau) et *genesis* (naissance), désigne un ensemble de phénomènes multiples conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau vasculaire préexistant.

C) Importance de l'angiogenèse au cours de la progression tumorale

Le phénomène d'angiogenèse est exploité par les cellules tumorales pour apporter, via le sang, l'oxygène et les nutriments qui sont nécessaires à leur croissance.

Judah Folkman, un chercheur américain (1933-2008) considéré comme le père fondateur des travaux portant sur l'angiogenèse tumorale, a démontré que dans la première étape de la prolifération, les cellules reçoivent leur oxygène par une diffusion passive. Quand la taille de la tumeur augmente, la perfusion passive d'oxygène n'est alors plus suffisante :

- ➔ Pour croître au-delà de 1 à 2 mm³ (petites tumeurs infra-cliniques), une tumeur doit recevoir de l'oxygène et des nutriments, sinon elle reste hypoxique (en manque d'oxygène) et finalement se nécrose. La tumeur doit alors attirer à elle des vaisseaux sanguins pour lui apporter l'oxygène nécessaire. Pour cela, les cellules tumorales vont envoyer des signaux pour déclencher la formation de nouveaux vaisseaux.

L'angiogenèse constitue une étape du développement de nombreux cancers, car la capacité pour une tumeur cancéreuse de grossir et de métastaser est étroitement liée à la prolifération des nouveaux vaisseaux sanguins qu'elle induit.

II. Les mécanismes de l'angiogenèse

A) Activation de l'angiogenèse au cours des différentes phases de la progression tumorale

Les chercheurs essayent de caractériser ce réseau vasculaire tumoral et de mettre en évidence les signaux qui induisent sa croissance dans le but de pouvoir contrôler la croissance des tumeurs.

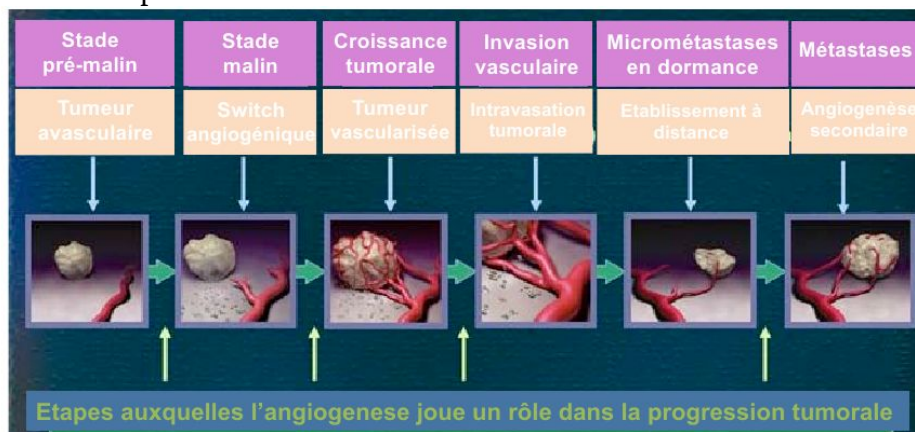
L'endothélium vasculaire est la couche la plus interne des vaisseaux sanguins, celle en contact avec le sang. Il est constitué de cellules endothéliales. Alors que dans les tissus normaux le réseau vasculaire est extrêmement hiérarchisé, ce n'est pas le cas dans les tumeurs. Des signaux proangiogéniques induisent une prolifération massive de cellules endothéliales, ce qui explique que les tumeurs sont très vascularisées.

Mais ces réseaux vasculaires sont extrêmement denses et instables. En effet, même si les tumeurs sont très vascularisées, elles ne sont pas pour autant extrêmement bien perfusées, car ces réseaux ne sont pas bien "finalisés". Par conséquent, il persiste en permanence dans ces tumeurs des zones qui ne sont pas correctement vascularisées et qui continuent à être hypoxiques (manquer d'oxygène).

Cette hétérogénéité tumorale est très importante, car c'est elle qui permet d'entretenir en permanence la formation de nouveaux vaisseaux.

Au cours du développement tumoral, différentes étapes se succèdent :

- un stade précancéreux, la tumeur n'a pas besoin de vaisseaux sanguins, elle est avasculaire,
- un stade malin (cancéreux) : un signal angiogénique (switch angiogénique) déclenche l'angiogenèse suite au manque d'oxygène (hypoxie),
- une vascularisation de la tumeur qui permet sa croissance,
- une invasion des cellules tumorales dans le réseau vasculaire, appelée intravasation,
- des cellules tumorales qui circulent via les réseaux sanguins ou lymphatiques (le mécanisme est à peu près le même) et des micrométastases en dormance,
- des métastases qui s'établissent dans des tissus distants,
- un cycle d'induction de l'angiogenèse déclenché par ces métastases de manière à être vascularisées et à proliférer.



L'angiogenèse joue un rôle majeur au cours de la progression tumorale. Cette découverte a bouleversé la compréhension de la biologie du cancer, ouvrant la voie à de nouveaux traitements (thérapie antiangiogénique).

B) Hypoxie et angiogenèse

L'hypoxie (baisse de concentration en oxygène) est un puissant activateur de l'angiogenèse. C'est en effet le signal (switch angiogénique) déclencheur de l'angiogenèse qui va permettre de restaurer une oxygénation des tissus et un apport de nutriments, entretenant ainsi la croissance tumorale.

Il faut savoir que l'oxygène diffuse passivement dans tous les tissus à des distances d'environ 100 à 300 microns. Les cellules proches des vaisseaux sanguins sont donc bien oxygénées alors que celles qui sont plus éloignées sont hypoxiques. Si ces cellules se mettent à proliférer, le déséquilibre va être encore plus important entre l'oxygène qui va diffuser et ces cellules tumorales qui ont un besoin fort en oxygène.

Ce déséquilibre va déclencher l'activation de voies moléculaires complexes, sous la dépendance des protéines qui stimulent l'expression d'une multitude de gènes pour promouvoir l'angiogenèse, ce qui permet l'adaptation de la cellule à l'hypoxie.

L'oxygène est indispensable à la vie. Il faut donc que l'organisme soit capable de réagir très vite à une baisse de la pression partielle en oxygène dans un tissu. C'est pourquoi les protéines de la famille HIF (*hypoxia-inducible factor* ou facteurs induits par l'hypoxie) sont fabriquées et dégradées en permanence.

Ainsi, dans une situation normale, lorsque les cellules ne manquent pas d'oxygène (normoxie), les protéines HIF sont en permanence fabriquées puis dégradées sous le contrôle d'autres protéines (prolyl hydroxylase) qui ont besoin d'oxygène (O₂) pour fonctionner. Cette hydroxylation (ajout du groupement hydroxyl OH) des protéines HIF entraîne une interaction avec la protéine VHL (von Hippel-Lindau) et aboutit à la dégradation de ces protéines dans une poubelle (le protéasome).

→ Tant qu'il y a de l'oxygène, ces protéines HIF sont dégradées, leur durée de vie n'excédant pas 3 à 5 minutes.

Mais s'il n'y a plus d'oxygène, ces protéines HIF ne peuvent plus être dégradées, car les protéines prolyl hydroxylase ne peuvent plus fonctionner. Les protéines HIF vont alors "transloquer", c'est à dire passer dans le noyau de la cellule, se fixer sur les régions régulatrices de l'ADN (le support de l'information génétique) qui permettent l'expression des gènes. Ce mécanisme va induire l'expression de gènes tels que celui du VEGF et donc l'angiogenèse.

L'angiogenèse est sous la dépendance du facteur de croissance vasculaire VEGF (*vascular endothelial growth factor*), gène cible de HIF (*hypoxia-inducible factor*), dont la finalité est d'augmenter le débit sanguin vers les tissus privés d'oxygène. Cette régulation de l'angiogenèse par HIF en réponse à l'hypoxie est essentielle, non seulement au cours du développement embryonnaire où elle est vitale, mais aussi après un accident ischémique pour permettre la revascularisation d'un tissu (l'ischémie représente la diminution de l'apport sanguin à un organe, par exemple lorsqu'un caillot sanguin obstrue une artère). L'angiogenèse est une des réponses physiologiques de sauvegarde mais qui, lorsqu'elle survient au sein d'une tumeur, va être délétère en favorisant la croissance tumorale.

C) Le bourgeonnement angiogénique

Les mécanismes de l'angiogenèse sont multiples :

- **Précurseurs endothéliaux** : il s'agit de l'implication de cellules mobilisées à partir de la moelle osseuse, sous l'influence de signaux émis par la tumeur, de manière à participer à l'angiogenèse. La recherche est active dans ce domaine : les chercheurs essaient de doser

ces précurseurs endothéliaux circulant dans l'organisme, car ils pourraient peut-être servir de marqueurs biologiques de l'efficacité d'un traitement antiangiogénique.

- **Intussusception** : de nouveaux vaisseaux sont formés par division de vaisseaux préexistants.
- **Lymphangiogenèse** : c'est le processus de formation des vaisseaux lymphatiques.
- **Bourgeonnement angiogénique** (*sprouting angiogenesis*) : c'est le premier mécanisme d'angiogenèse à avoir été décrit et le mieux caractérisé.

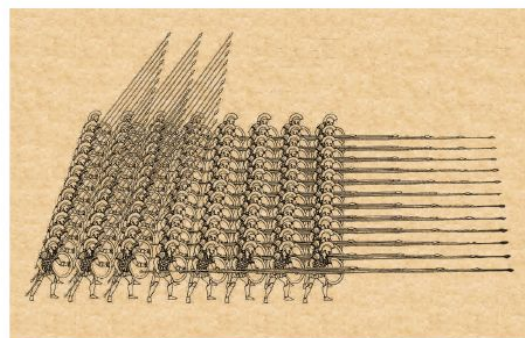
Description de l'angiogenèse par bourgeonnement :

Il s'agit du mécanisme qui permet à un vaisseau d'émettre des prolongements qui vont aller vers la tumeur pour l'irriguer.

A l'intérieur du corps humain se trouvent 150 000 km de vaisseaux sanguins très hiérarchisés sous forme d'artères, d'artérioles, de veines, de capillaires et dont la lumière est tapissée par des cellules endothéliales. Leur superficie représente à peu près l'équivalent d'un terrain de football, ils pèsent environ 1,5 kg pour un adulte.

Les cellules endothéliales sont des cellules qui ne prolifèrent pas beaucoup. Pourtant, le remplacement permanent des cellules endothéliales détachées ou abimées est indispensable à la préservation d'une fonction cardio-vasculaire normale.

Ce n'est que depuis peu que les chercheurs s'intéressent à ces cellules endothéliales qui étaient appelées cellules pavimenteuses, car au contact les unes des autres de façon très jointive comme dans une rue pavée. Ces cellules phalanges sont bien organisées, comme une armée romaine, avec des boucliers les uns à côté des autres. Pour permettre aux vaisseaux sanguins de croître pour irriguer les tumeurs, il faut déstabiliser cet équilibre.



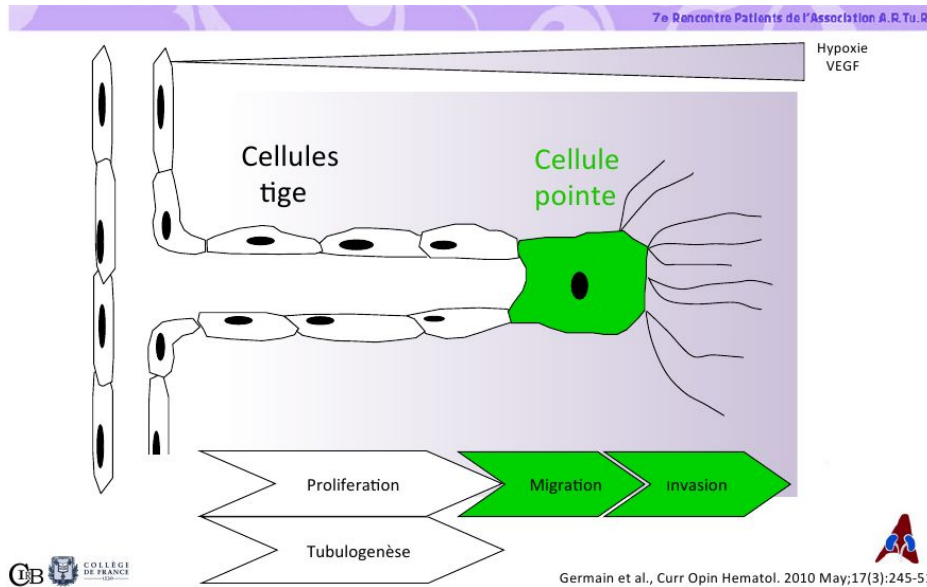
Cellules phalanges → Cellules de la pointe



Les cellules tumorales qui prolifèrent et se retrouvent en hypoxie émettent des signaux qui vont parler à ces cellules endothéliales. Sous l'influence de l'hypoxie, nous avons vu que différents signaux vont activer le facteur de croissance VEGF qui va alors "demander" aux cellules endothéliales de "pousser" vers les cellules qui ont besoin d'oxygène et de nutriments pour continuer leur croissance.

Les cellules endothéliales s'activent alors et étendent des prolongements appelés des filopodes, schématisés ici par les lances. Ces filopodes sont des petits fils issus de la cellule pour aller explorer son environnement et vasculariser le tissu qui les attire par besoin d'oxygène.

Les cellules phalanges se transforment en cellules de la pointe, c'est à dire pointe du nouveau vaisseau sanguin. Elles émettent des prolongements vers les zones hypoxiques dans lesquelles le VEGF est exprimé. Les cellules de la pointe sont impliquées dans les mécanismes d'invasion et de migration.



- ➔ Ces cellules de la pointe sont un peu comme la locomotive de ce "train de cellules" qui va former un nouveau vaisseau sanguin, les cellules de la tige étant les wagons. Celles-ci vont proliférer de manière à faire croître ce nouveau vaisseau.

Le travail des chercheurs consiste à comprendre quels sont les mécanismes impliqués dans ces changements de cellules plutôt passives (elles conduisent le sang) et qui se trouvent subitement activées et se mettent à pousser pour irriguer une tumeur en plusieurs étapes. Ils sont capables de reconstruire ces réseaux *in vitro* pour comprendre ces mécanismes et tester de nouveaux médicaments.

D) Les signaux : le VEGF et son récepteur le VEGFR

Ces réseaux *in vitro* leur permettent de comprendre les étapes de transmission de ces signaux de croissance et les mécanismes de transduction du signal ; c'est à dire, comment un signal émis par une cellule tumorale et qui est donc à l'extérieur d'une cellule endothéliale vient parler à cette cellule endothéliale et comment cette cellule endothéliale intègre tous ces signaux... dans le but de trouver des médicaments capables de cibler ces mécanismes et donc de freiner l'angiogenèse.

Nous avons vu que les cellules tumorales sont capables d'exprimer des facteurs de croissance régulés par l'hypoxie. C'est le cas du facteur de croissance vasculaire VEGF qui est le principal facteur activant la croissance des vaisseaux sanguins qui vont irriguer la masse de cellules tumorales.

Le VEGF est sécrété par la tumeur, il va pouvoir "parler" aux cellules vasculaires, car elles présentent (expriment) à leur surface une protéine appelée le récepteur du VEGF, c'est le VEGFR de type 1 ou le VEGFR de type 2.

Il faut bien comprendre que ces signaux sont multiples. Plusieurs types de facteurs de croissance sont connus. Dans la famille du VEGF, les chercheurs ont mis en évidence un VEGF A, B et E, mais aussi des membres qui leur ressemblent (sans doute apparus au cours de l'évolution par duplication génique). Tous ces facteurs vont également venir "parler" aux cellules endothéliales pour promouvoir l'angiogenèse.

Un mécanisme semblable est régulé par 2 autres types de VEGF, le VEGF C et le VEGF D qui

viennent se lier sur un 3^{ème} type de récepteur, le VEGFR de type 3 pour activer la lymphangiogenèse qui fonctionne sur le même principe, mais concerne les vaisseaux lymphatiques qui vont envahir les tumeurs.

Stéphane Germain avoue que les chercheurs ne savent pas encore vraiment comment tout cela se passe : « En terme de recherche, le futur ne manque pas d'avenir ! ».

E) Les récepteurs du VEGF... et les autres !!!

Ces différents types de récepteurs du VEGF appartiennent à une grande famille de récepteurs qui ont tous évolué à partir d'un ancêtre commun. C'est pourquoi le récepteur du facteur de croissance de l'insuline (IGFR), le récepteur du facteur de croissance fibroblastique (FGFR) ou encore le récepteur du facteur de croissance épidermal (EGFR) ont des propriétés de transmission du signal qui sont très semblables.

On comprend alors pourquoi il est difficile pour les chercheurs de trouver des médicaments capables d'inhiber spécifiquement un récepteur sans agir sur les autres récepteurs puisqu'ils se ressemblent énormément. De même, ces similitudes peuvent également expliquer la survenue des effets secondaires avec ces traitements.

F) Mécanismes de l'angiogenèse : les cibles

Pour bloquer cette transmission, il est possible de cibler l'interaction entre les protéines facteurs de croissance, comme le VEGF (ce sont des ligands, car capables de se lier et de former un complexe avec un récepteur), et leurs récepteurs :

- En ciblant la protéine facteur de croissance elle-même (le ligand) avec des anticorps qui vont la bloquer en se fixant dessus et ainsi l'empêcher d'interagir avec son récepteur. C'est le mode d'action du bevacizumab (Avastin) qui est un anticorps anti-VEGF, c'est à dire qu'il se lie au VEGF pour l'empêcher de se fixer sur son récepteur.
- Si le ligand a pu se fixer sur son récepteur, il est possible de bloquer le fonctionnement de ce récepteur en utilisant des inhibiteurs des protéines à activité tyrosine kinase. Les tyrosine kinases (TKI) sont des enzymes spécifiques qui se trouvent dans certains récepteurs de facteurs de croissance situés à la surface des cellules, tel le récepteur au VEGF (mais aussi des récepteurs d'autres facteurs). Les inhibiteurs des tyrosine kinases empêchent que ce récepteur transduise le signal à la cellule endothéliale pour l'activer.
C'est le mode d'action du sorafenib (Nexavar), du sunitinib (Sutent), du pazopanib (Votrient) et de l'axitinib (Inlyta). Ces substances inhibent également d'autres facteurs importants qui contribuent à l'évolution du cancer du rein.
- Ou encore, et c'est une voie de recherche, en bloquant avec un anticorps le domaine extracellulaire du récepteur sur lequel se lie le ligand pour justement empêcher que ce ligand se lie à son récepteur.

Les recherches effectuées ont permis d'aboutir à la mise sur le marché de différents médicaments qui ont montré une efficacité dans le traitement du cancer du rein. Le but de ces médicaments est d'essayer de freiner l'angiogenèse en bloquant la transmission des signaux envoyés par les cellules tumorales qui manquent d'oxygène, c'est à dire, d'empêcher le facteur de croissance vasculaire, le VEGF, de "parler" à la cellule endothéliale pour lui demander de fabriquer de nouveaux vaisseaux.

G) Mécanismes de l'angiogenèse : les limites

Malgré ces avancées pourtant considérables et qui ont révolutionné le traitement du cancer du rein métastatique, il reste encore des limites et des interrogations auxquelles les chercheurs devront tenter de répondre :

* Il s'agit tout d'abord du coût de ces médicaments qui est très élevé.

* Également le fait qu'il n'existe pas de facteurs prédictifs qui permettent de :

- savoir si tel ou tel patient va être répondeur ou non à un de ces médicaments,
- connaître l'efficacité de ces médicaments sur une tumeur,
- prévoir l'apparition de résistance.

* La possible existence d'un effet rebond des antiangiogéniques qui entraînerait une perte du bénéfice initial observé avec l'allongement de la survie sans progression.

En effet, ces médicaments antiangiogéniques pourraient n'être efficaces qu'un certain temps, car les cellules tumorales sont comme leur nom l'indique, malignes : elles peuvent mettre en place de nouveaux mécanismes (changer de signaux) sous la pression de sélection des antiangiogéniques utilisés pour contourner cette pression et activer à nouveau l'angiogenèse et continuer à proliférer.

* Le fait qu'une augmentation de la survie sans progression ne se traduise pas (forcément) par une augmentation de la survie globale suggère que la survie sans progression n'est (peut-être) pas un critère fiable pour les essais cliniques dans les cancers métastatiques...

Conclusion

... il faut continuer la recherche dans le domaine de l'angiogenèse en cancérologie.

Stéphane Germain a conclu sa présentation avec 2 citations :

« Plus notre connaissance augmente, plus notre ignorance se dévoile », John Fitzgerald Kennedy.

« La recherche a besoin d'argent dans deux domaines prioritaires : le cancer et les missiles antimissiles. Pour les missiles antimissiles, il y a les impôts, pour le cancer, on fait la quête », Pierre Desproges.

Les questions dans la salle

Est-ce que ces recherches pourraient permettre d'aboutir à des tests de dépistage du cancer du rein ou d'éviter des retards (ou erreurs) de diagnostic ?

Pour répondre à cette question, Stéphane Germain a expliqué les recherches qu'il dirige actuellement dans son laboratoire :

Il y a 3 ans, ces recherches ont permis d'identifier un facteur de croissance autre que le VEGF qui est fabriqué par les cellules du cancer du rein à cellules claires et se retrouve ensuite dans la circulation sanguine. L'expression de cette protéine pourrait permettre l'identification d'un cancer du rein à cellules claires et donc peut-être un jour, en terme de biomarqueur, permettre le diagnostic d'un cancer du rein à cellules claires à partir d'une prise de sang.

Mais avant cela, il faut d'abord que cette hypothèse soit validée par d'autres études. Il faut ensuite que les chercheurs mettent au point des outils qui permettent l'identification et le dosage précis des taux circulants de cette protéine. Cette étape peut nécessiter 1 ou 2 années. Une fois ces outils développés, les chercheurs doivent les proposer aux oncologues pour leur permettre de tester leur hypothèse (à savoir si la présence de ce marqueur signe la présence d'un cancer du rein) sur des prélèvements sanguins de patients qui ont un cancer du rein. Et c'est là-dessus que travaille actuellement l'équipe du Dr Stéphane Germain.

De plus, comme ce marqueur est synthétisé par la tumeur, il peut être utile d'analyser également des prélèvements de patients sous traitement antiangiogénique pour voir si ce biomarqueur circulant pourrait permettre de savoir si un patient donné répond au traitement que lui a prescrit son oncologue : si le traitement est efficace, la tumeur va diminuer de taille, il y aura donc moins de cellules tumorales qui vont fabriquer ce marqueur et il y aura donc, a priori, moins de marqueurs circulants dans le sang.

Ces différentes étapes (mise en évidence d'un marqueur potentiel, développement des outils pour le doser, recrutement de sérums, réalisation des dosages, validation...) demandent beaucoup de temps et d'argent. C'est seulement après toutes ces étapes et leur validation que ces recherches pourraient un jour aboutir à l'utilisation d'un biomarqueur du cancer du rein.

La famille du VEGF est une famille nombreuse, mais est-ce que dans notre propre tumeur du rein, il existe un seul VEGF qui pourrait être la cible de notre traitement ?

Le VEGF actuellement ciblé par les médicaments utilisés dans le cancer du rein est le VEGF de type A. Il s'agit du VEGF qui se trouve en très grande quantité dans les tumeurs du rein (voir le schéma avec le pic de VEGF dans la présentation du Dr Escudier).

Les chercheurs savent qu'il existe beaucoup d'autres types de facteurs de croissance mais ils n'ont pas actuellement une idée précise de leur expression, faute de pouvoir mettre en place ces recherches.

Le problème est qu'il n'existe pas d'études qui comptent un nombre suffisant de patients ayant différents types de cancers du rein et différents traitements, et dans lesquelles les autres types de VEGF comme les types A, B, C ou D ou d'autres types de facteurs de croissance ont été dosés.

Ils savent que tous les patients n'ont pas le même pic de VEGF, certains en ont plus, d'autres moins, mais ils ne savent pas pourquoi et quels sont les signaux différentiels qui expliquent l'expression différente de ces facteurs de croissance.

Stéphane Germain a insisté sur l'hétérogénéité des événements moléculaires qui conduisent à la cancérogenèse (développement de la tumeur cancéreuse) et à l'angiogenèse, ce qui explique qu'un cancer du rein apparu chez un patient donné et un autre chez un autre patient ne sont pas les mêmes, même s'il s'agit de 2 cancers du rein à cellules claires, car les mécanismes mis en jeu ne sont pas les mêmes.

Est-ce qu'il serait possible d'agir pour empêcher le développement de métastases à distance ?

La recherche est également très active pour comprendre les mécanismes qui font qu'une cellule tumorale peut arriver à s'échapper et comment les capacités d'intravasation (passage de la cellule tumorale dans le vaisseau sanguin pour s'échapper de la tumeur et coloniser d'autres tissus) de la cellule tumorale sont régulées. Comment une cellule tumorale peut-elle s'échapper de la tumeur, entrer dans les vaisseaux sanguins, circuler dans ces vaisseaux, sortir de ces vaisseaux (extravasation) pour se fixer sur un autre tissu à distance ? Et pourquoi à un moment donné, de nouveaux mécanismes d'angiogenèse se mettent-ils en place pour cette métastase ?

C'est le fruit d'une recherche très importante dans le monde entier. Il est possible que certaines cellules immunitaires participent à ce phénomène conduisant au développement des métastases.



Compte-rendu rédigé par Nathalie Bedu, bénévole de l'association A.R.Tu.R. Ce compte-rendu a été relu et validé par le Dr Stéphane Germain. Il est la propriété d'A.R.Tu.R. et ne peut être utilisé que pour un usage strictement privé. Toute autre utilisation est interdite sans autorisation préalable d'A.R.Tu.R.