

université  
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE  
PHARMACIE

# NOTIONS DE BASE SUR L'ANGIOGENÈSE

**Pr. Marc VASSE**

**Faculté de Pharmacie – Paris-Saclay**

**(INSERM UMR-S 1176)**

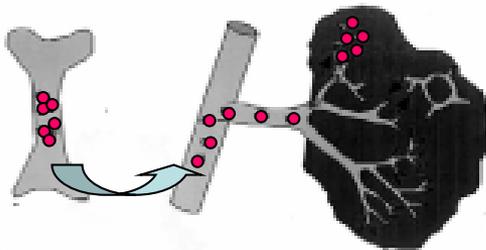
UEL 343



# DEFINITIONS

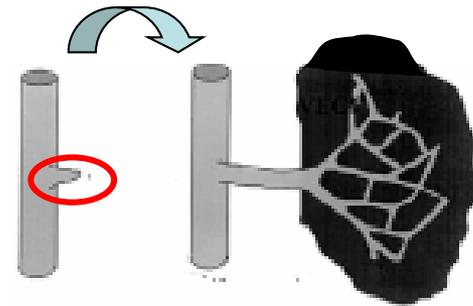
## Vasculogenèse :

migration, différenciation et association des cellules progéniteurs vasculaires pour former des vaisseaux sanguins primitifs

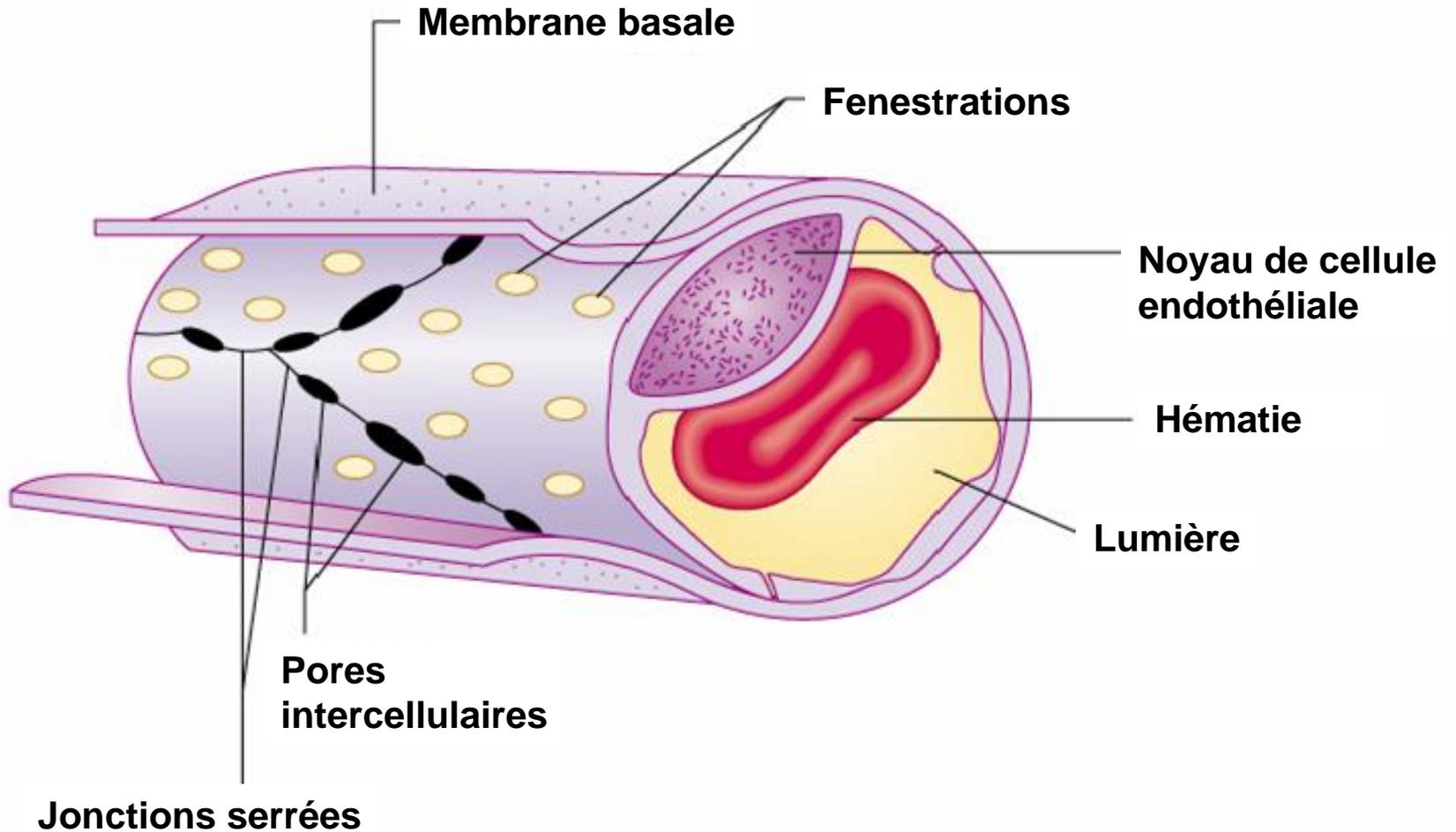


## Angiogenèse :

Croissance, extension de l'arbre Vasculaire pré-existant pour Former un réseau de type Essentiellement capillaire



# STRUCTURE D'UN CAPILLAIRE



# LA NEO-ANGIOGENESE

## - Physiologique :

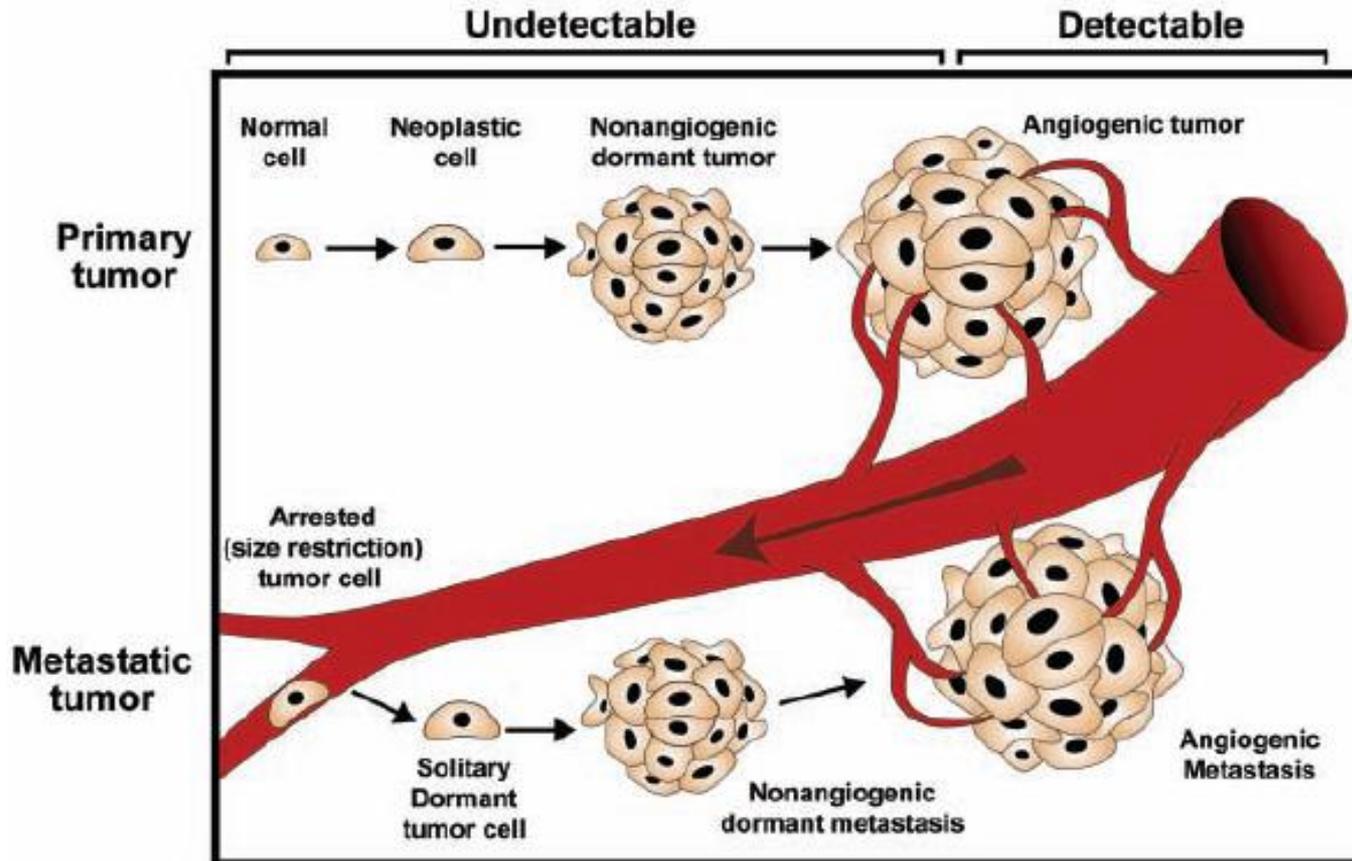
- pendant le développement embryonnaire (associée à la vasculogénèse)
- 0,1 % des cellules endothéliales prolifèrent chez l'adulte
  - développement des muscles, du tissu adipeux
  - cicatrisation
  - maturation du corps jaune et de la muqueuse utérine
  - développement du placenta

## - Pathologique :

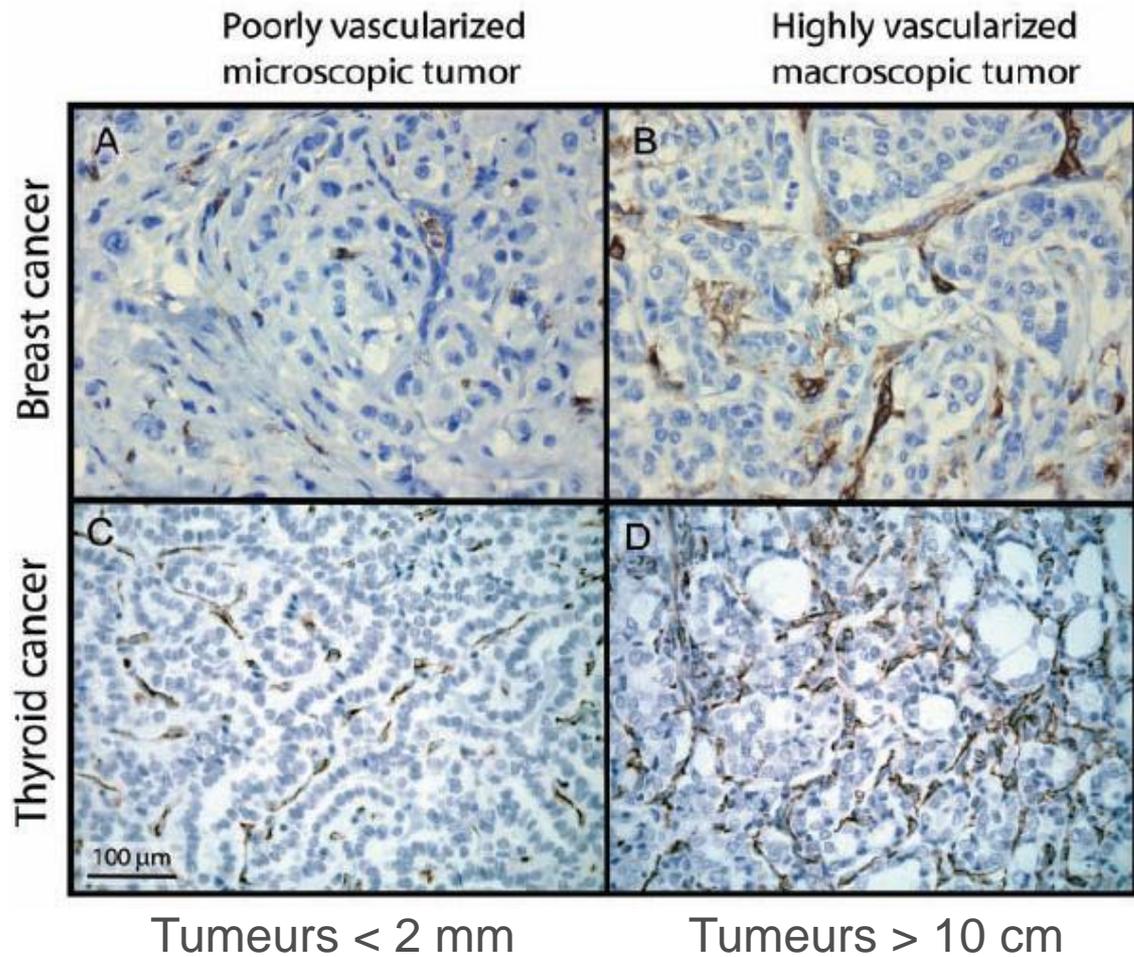
- régénération tissulaire post-ischémie
- inflammation (arthrite, psoriasis...)
- athérosclérose (vascularisation de la plaque...)
- rétinopathie diabétique
- cancer

# L'ANGIOGENESE TUMORALE

Phase «avasculaire»  
Tumeur < 1-2 mm de Ø



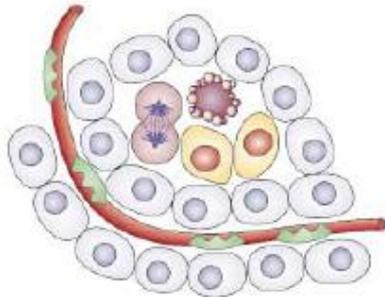
# DENSITE DES NEOVAISSEAUX EN FONCTION DE LA TAILLE DE LA TUMEUR



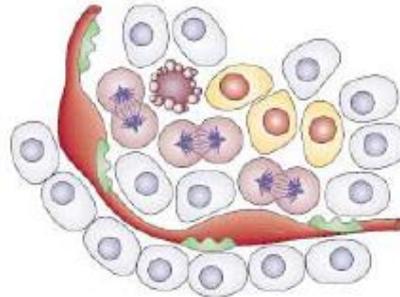
Marquage des cellules endothéliales par le CD 31 (marron)

# LES ETAPES DE LA NEOANGIOGENESE TUMORALE

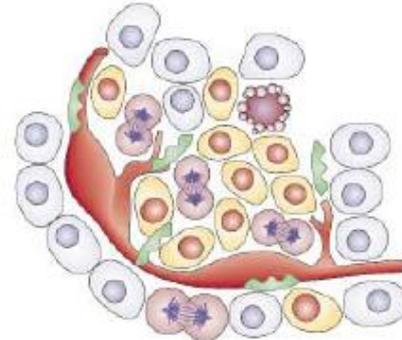
**a** Dormant



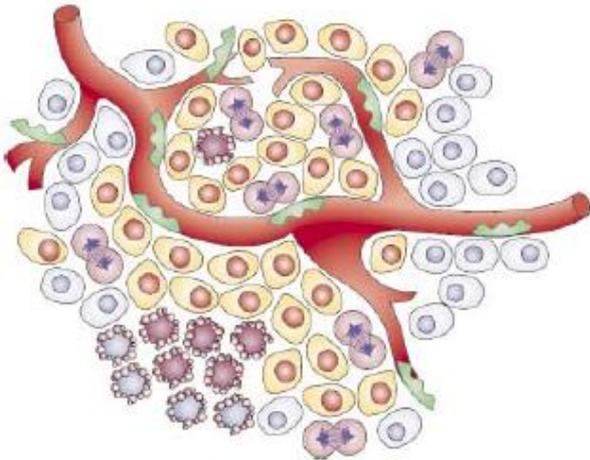
**b** Perivascular detachment and vessel dilation



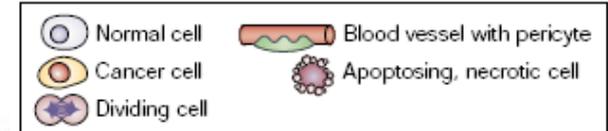
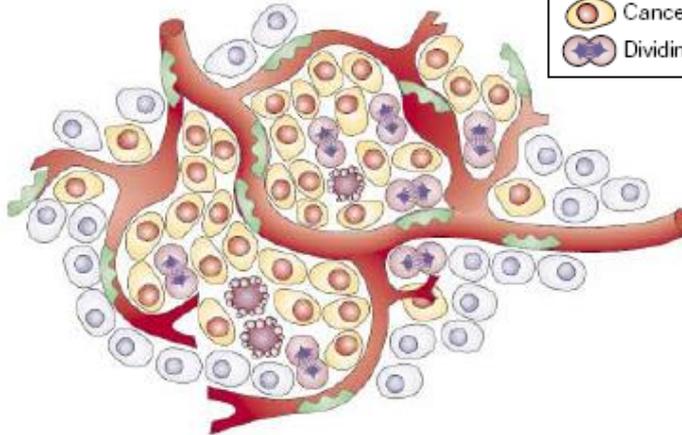
**c** Onset of angiogenic sprouting



**d** Continuous sprouting; new vessel formation and maturation; recruitment of perivascular cells

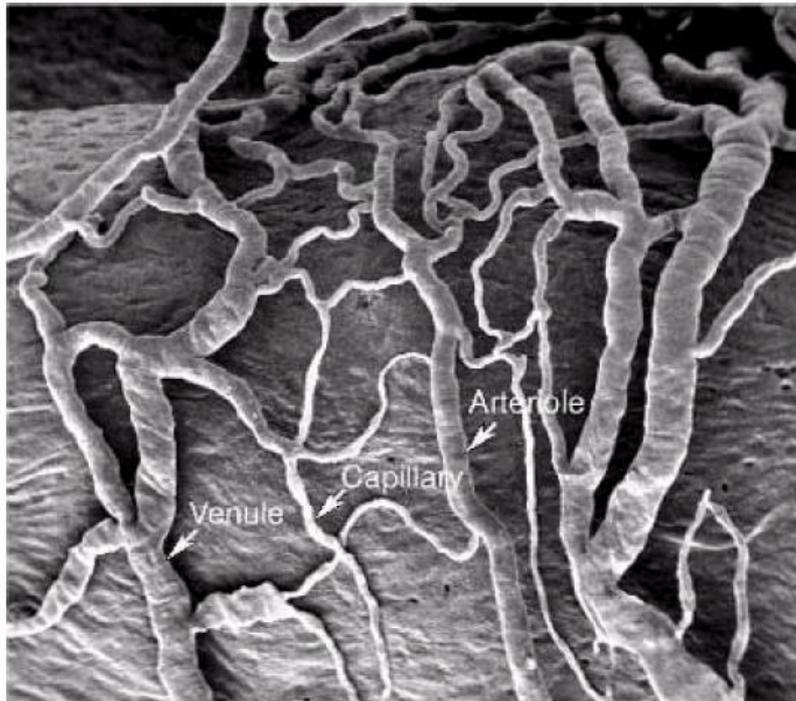


**e** Tumour vasculature

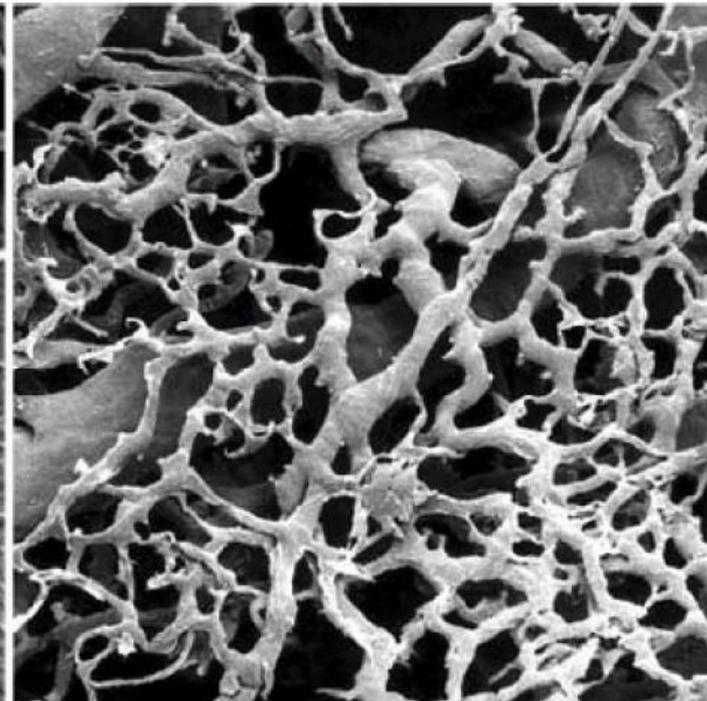


# STRUCTURE ANORMALE DES NEOVAISSEAUX TUMORAUX

- Excès de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) qui favorise la perméabilité vasculaire (*Vascular Permeability Factor*)
- Insuffisance de péricytes pour maintenir une structure organisée
- Certaines isoformes de VEGF (121) induisent cette structuration lâche



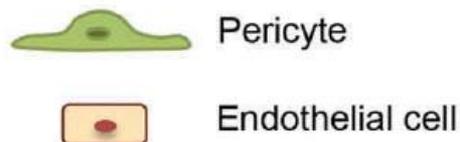
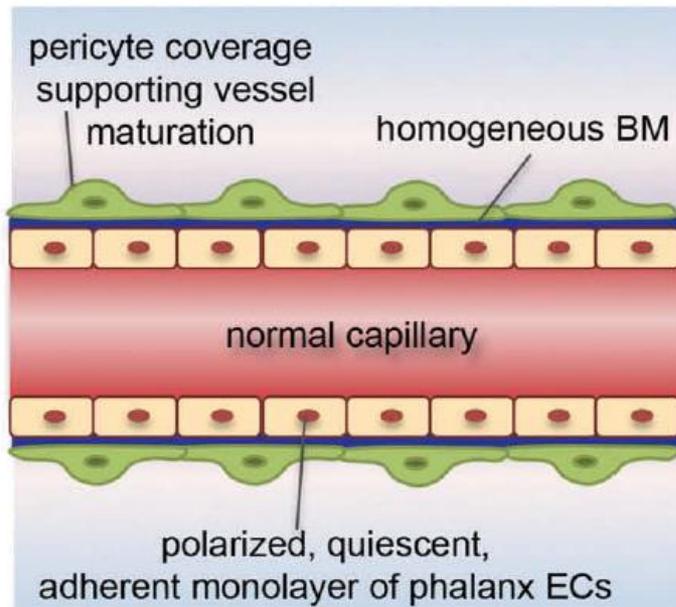
Vaisseaux «normaux»



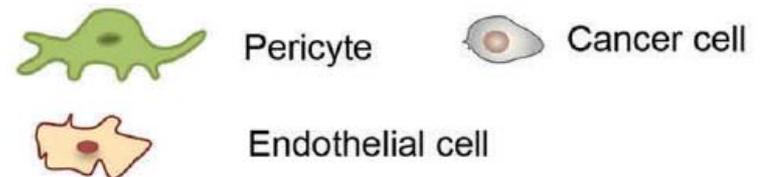
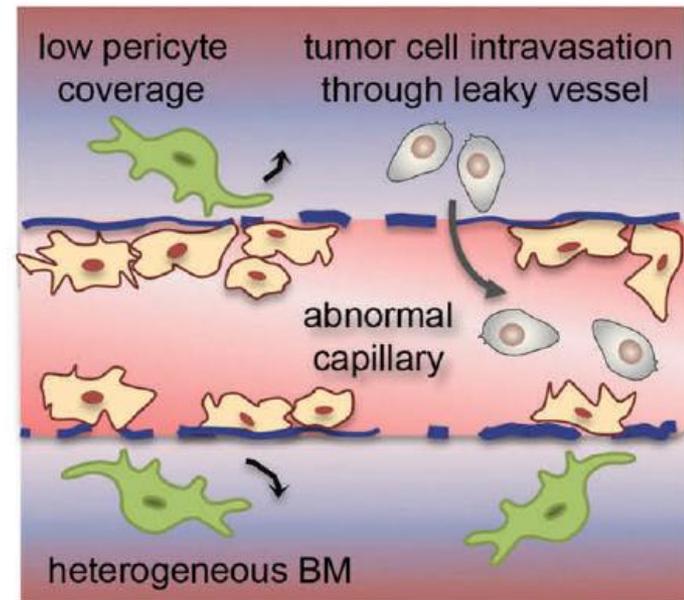
Angiogenèse tumorale

# LA STRUCTURE ANORMALE DES NEOVAISSEAUX FAVORISE LA DISSEMINATION TUMORALE

## Normal Tissue

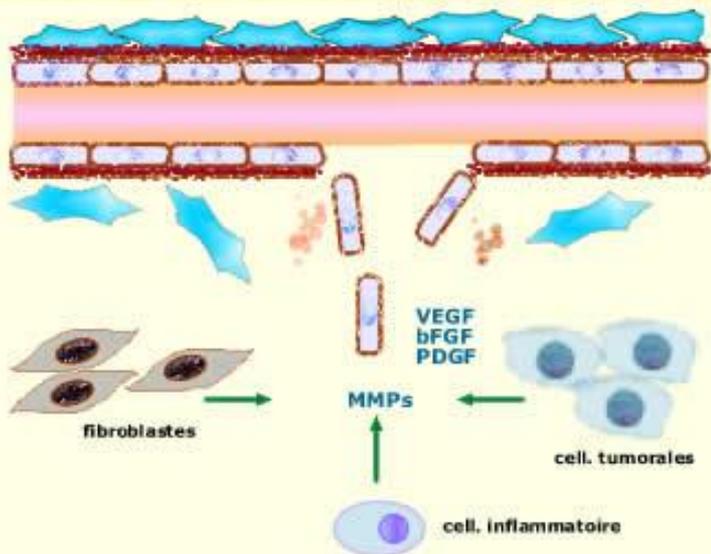


## Tumor



# LES MECANISMES DE L'ANGIOGÉNÈSE TUMORALE

## Les premières étapes de l'angiogenèse



1. Détachement des péricytes
2. Dégradation de la membrane basale vasculaire (MBV)
3. Migration et prolifération des cellules endothéliales

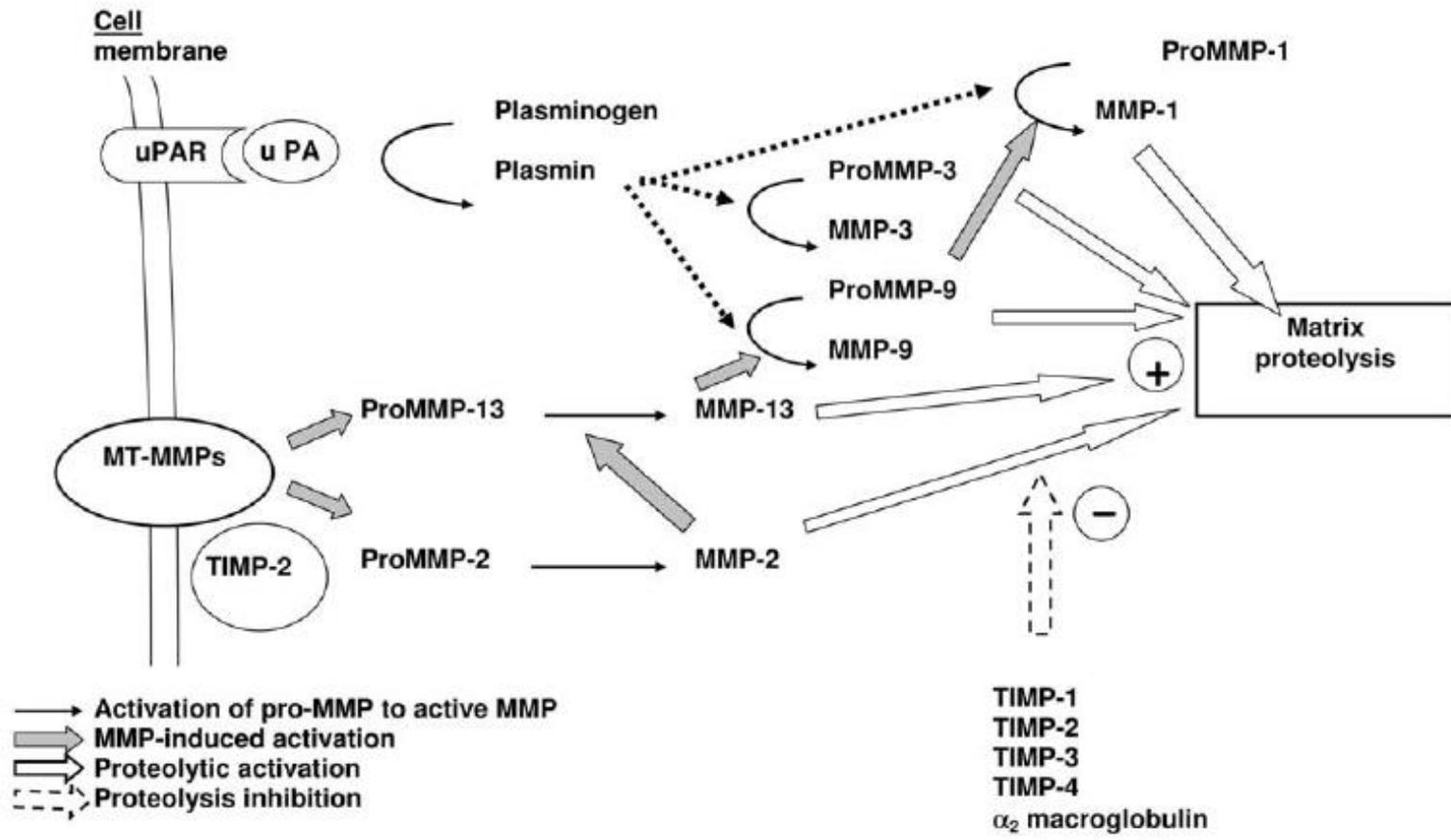
Les phases d'initiation de l'angiogenèse:

- 1- Augmentation de la perméabilité vasculaire et dépôt extravasculaire de fibrine (VEGF)
- 2- Dissociation de la structure du vaisseau (MMP)
- 3- **Dégradation de la membrane basale**
- 4- Migration des cellules endothéliales et invasion de la MEC
- 5- Prolifération des cellules endothéliales
- 6- Formation de la lumière capillaire

# LES METALLOPROTEASES

Collagenases	Interstitial collagenase	MMP-1	11q22.3	Collagens I, II, III, VII, VIII, X, MMP-2, MMP-9
	Neutrophil collagenase	MMP-8	11q21	Collagens I, II, III, V, VII, VIII, X, fibronectin
	Collagenase-3	MMP-13	11q22.3	Collagens I, II, III, V,
Gelatinases	Gelatinase A (72 kDa type IV collagenase)	MMP-2	16q21	Collagens I, IV, V, VII, X, XI, XIV, elastin, fibronectin
	Gelatinase B (92 kDa type IV collagenase)	MMP-9	20q11.2-13.1	MMP-9, MMP-13 Collagens IV, V, VII, X, XIV, elastin, fibronectin
Stromelysins	Stromelysin-1	MMP-3	11q22.3	Collagens III, IV, IX, et X, PLP, fibronectin, laminin, elastin, MMP-1, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
	Stromelysin -2	MMP-10	11q22.3	Collagens III, IV, V, elastin, fibronectin, MMP-1, MMP-8
	Stromelysin -3	MMP-11 MMP-19	22q11.2 12q14	
Membrane type	MT-MMP-1	MMP-14	14q11-q12	Collagens I, II, III, fibronectin, vitronectin, MMP-2, MMP-13, laminin
	MT-MMP-2	MMP-15	16q13-q21	MMP-2, laminin, fibronectin
	MT-MMP-3	MMP-16	8q21-q22.1	MMP-2
	MT-MMP-4	MMP-17	12q24.33	-
Matrilysins	MT-MMP-5	MMP-24	-	-
	MT-MMP-6	MMP-25	-	-
	Matrilysin-1	MMP-7	11q21-q22	Collagens IV, X, fibronectin, laminin, elastin
	Matrilysin-2	MMP-26		
-	Metalloelastase	MMP-12	11q22.2-22.3	Collagen IV, elastin, fibronectin, vitronectin, laminin
	Others	MMP-18 to -23 MMP-27,-28	-	-

# ACTIVATION DES METALLOPROTEASES ET DEGRADATION DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE



(Beaudeau et al, Clin Chem Lab Med, 2004)

# L'UROKINASE (u-PA)

Sérine protéase, identifiée dans l'urine, dans le plasma et dans surnageant de fibroblastes

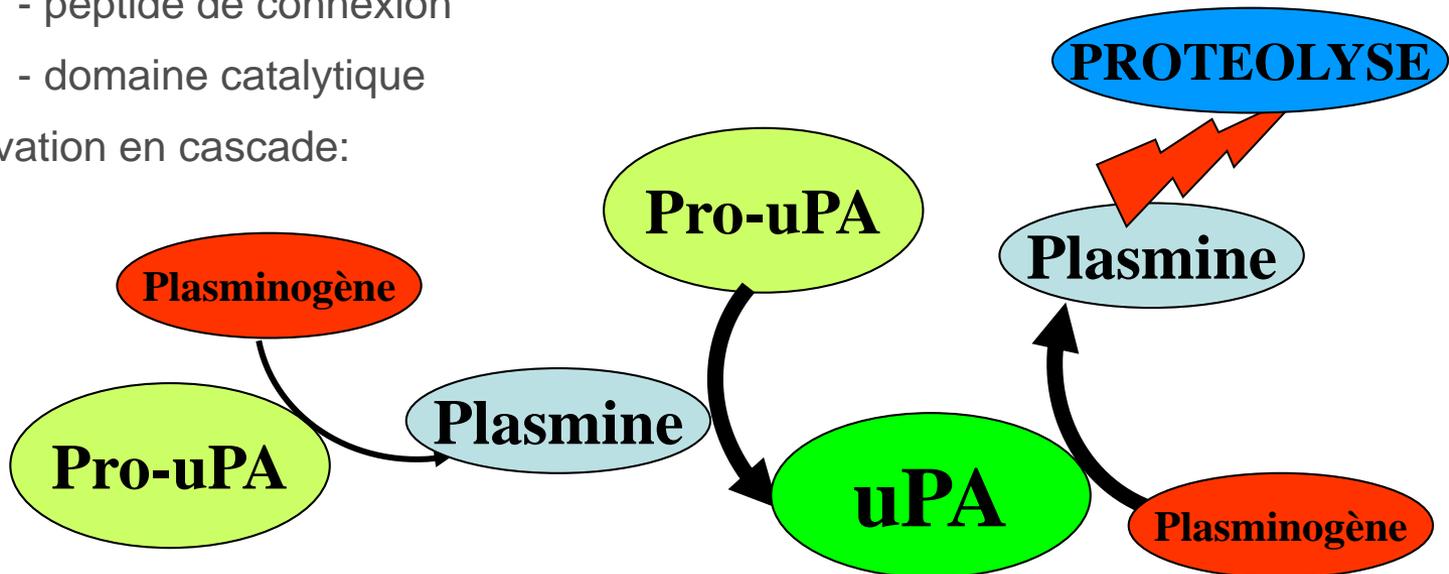
En fait présente à la surface de la totalité des cellules de l'organisme

Activateur du plasminogène, mais rôle modéré dans la thrombolyse

Sécrétée sous forme de pro-uPA (55 kDa), 3 domaines

- ATF (Amino Terminal Fragment): site de liaison au récepteur
- peptide de connexion
- domaine catalytique

Activation en cascade:

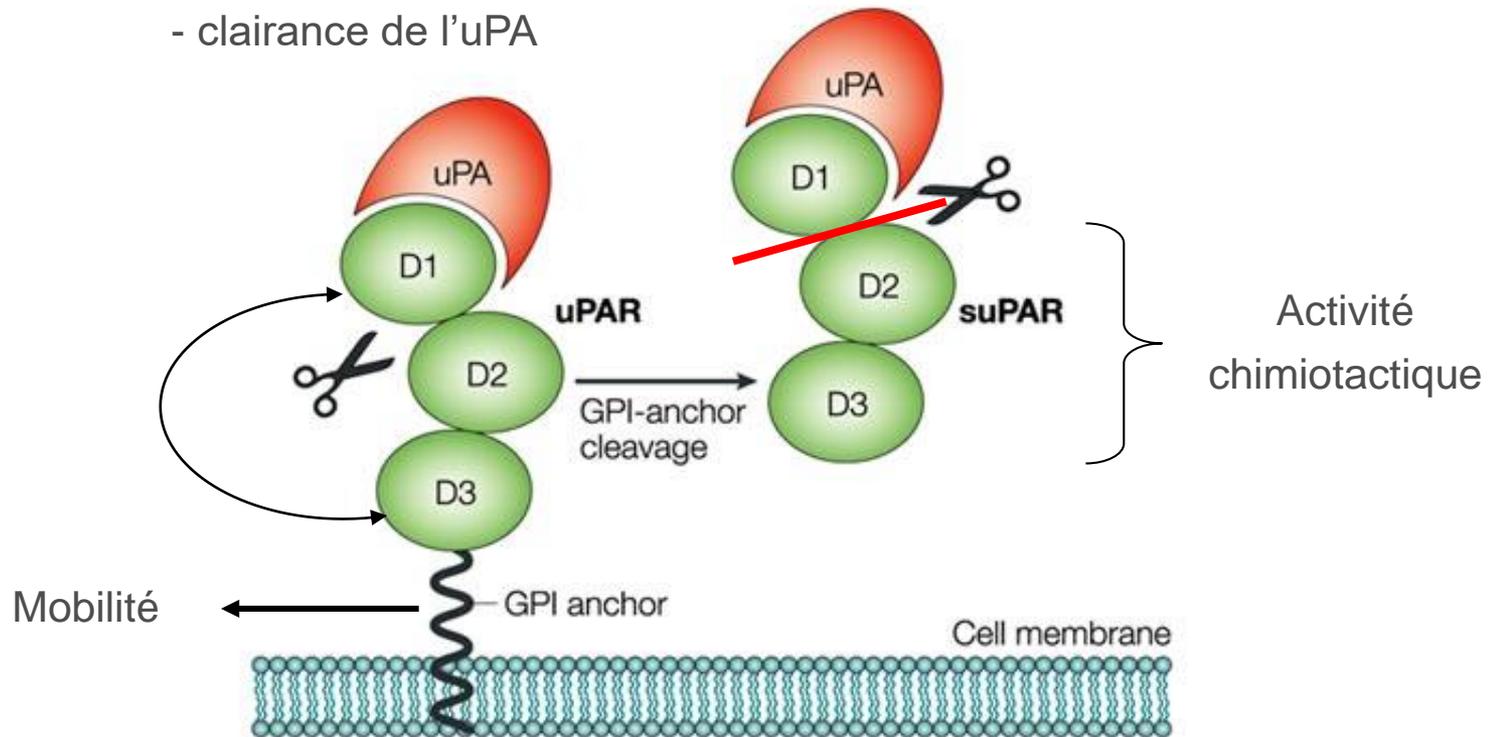


Inhibition: Plasminogen Activator Inhibitors 1 et 2 (PAI-1 et PAI-2)

# STRUCTURE DU RECEPTEUR DE L'UROKINASE

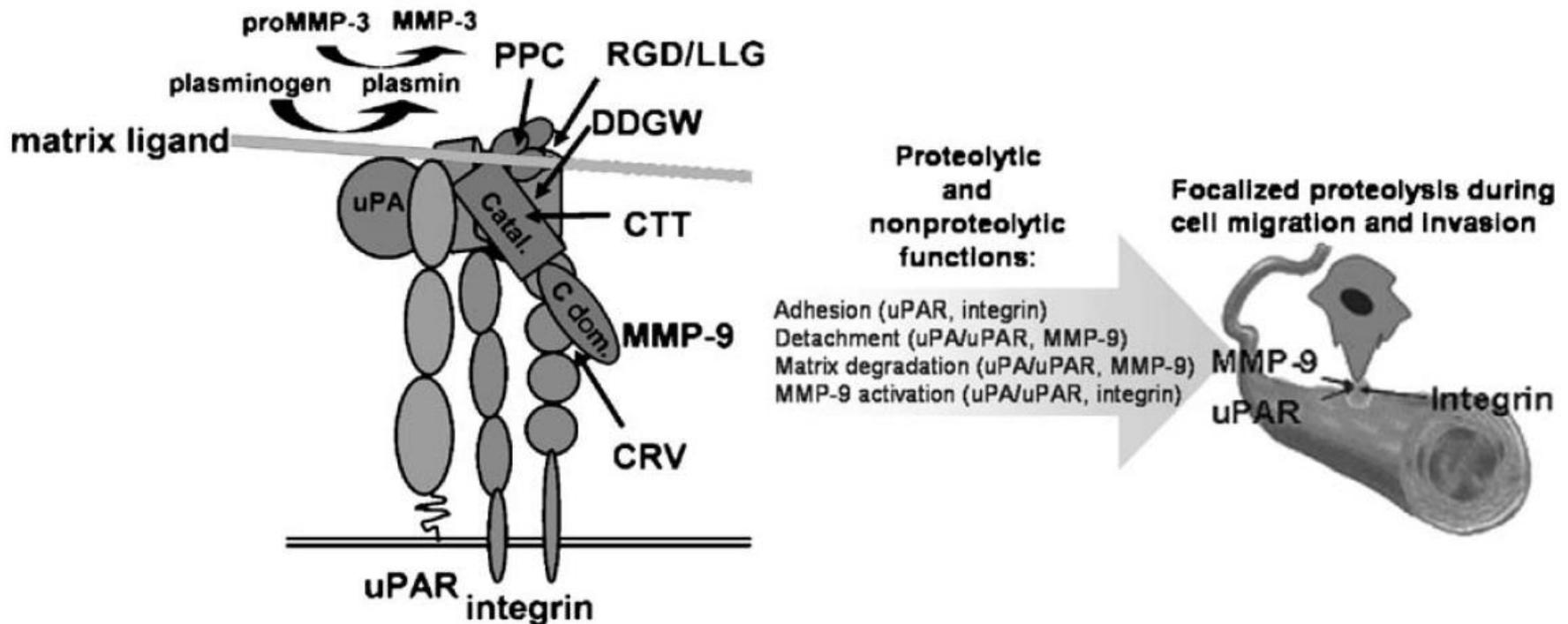
Glycoprotéine de 55 kDa, fortement glycosylée,  
ancrée dans la membrane par un glycophosphatidyl inositol

- 3 fonctions:
- localisation de l'uPA sur la membrane cellulaire (AA 1-48; AA 136-143)
  - fixation de la vitronectine
  - clairance de l'uPA



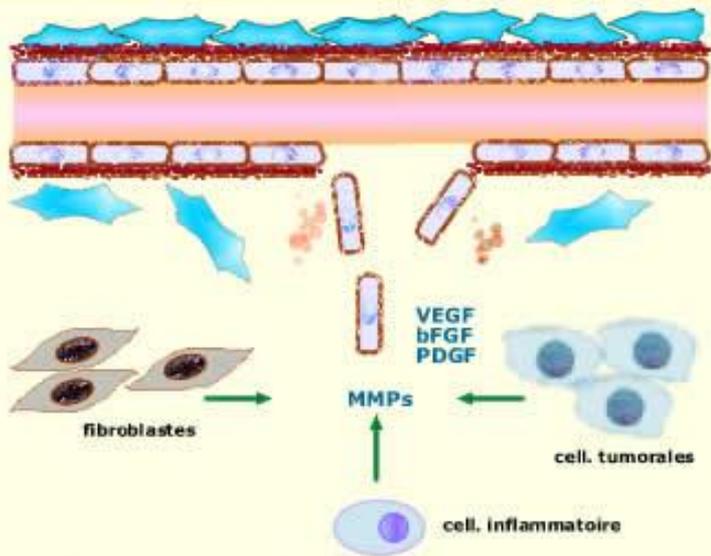
# L'INVADOSOME

- Assemblage de protéases (MMP, u-PA), d'intégrines et de molécules d'invasion à la surface des cellules endothéliales permettant la dégradation de la matrice, l'extravasation de cellules et la transmission de signaux de survie aux cellules



# MIGRATION CELLULAIRE ET ANGIOGÉNÈSE

## Les premières étapes de l'angiogenèse

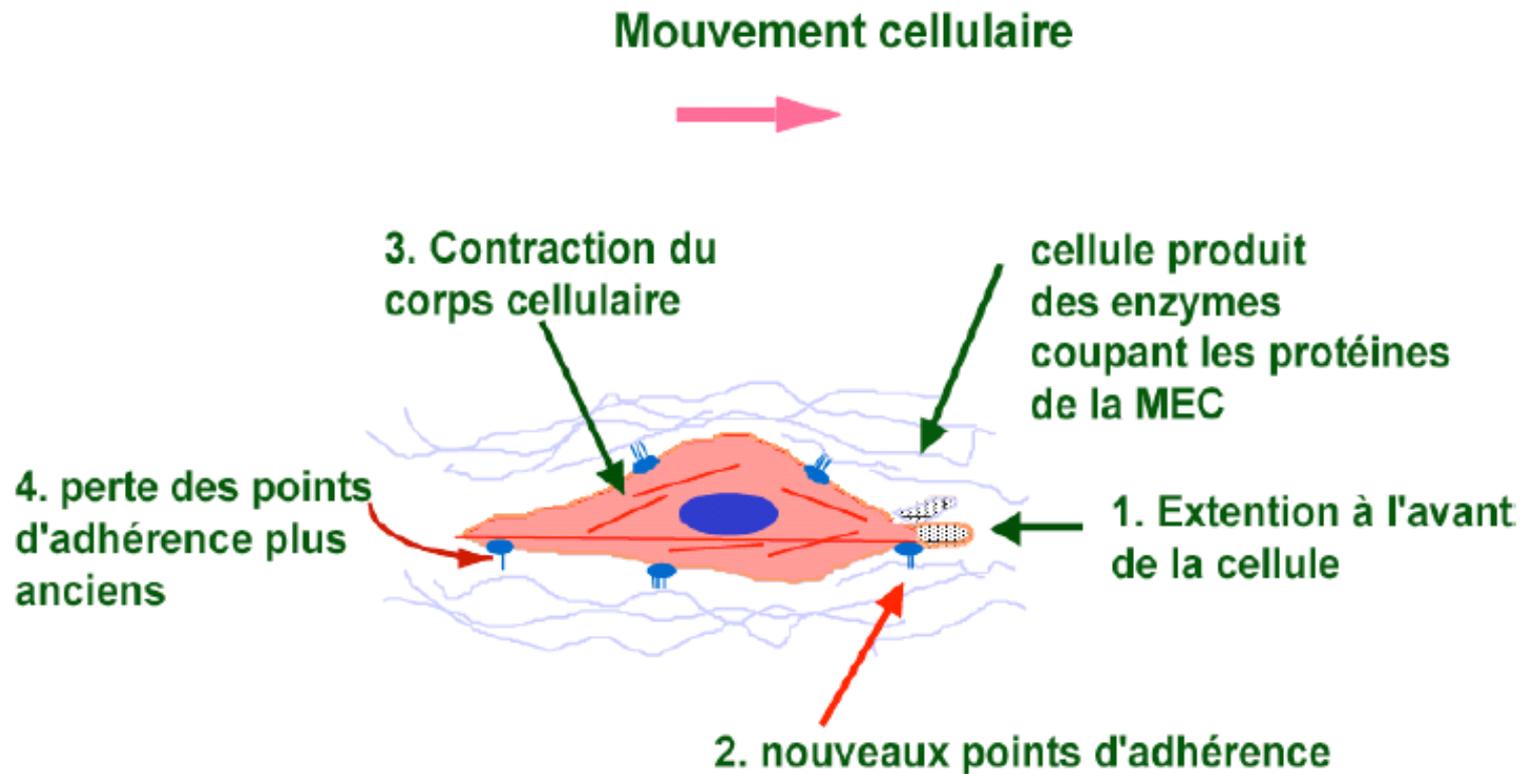


1. Détachement des péricytes
2. Dégradation de la membrane basale vasculaire (MBV)
3. Migration et prolifération des cellules endothéliales

Les phases d'initiation de l'angiogenèse:

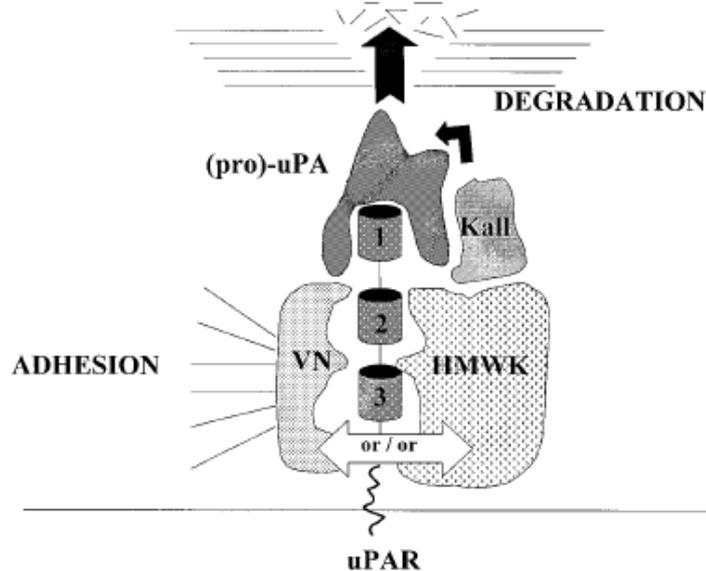
- 1- Augmentation de la perméabilité vasculaire et dépôt extravasculaire de fibrine (VEGF)
- 2- Dissociation de la structure du vaisseau (MMP)
- 3- Dégradation de la membrane basale
- 4- **Migration des cellules endothéliales et invasion de la MEC**
- 5- Prolifération des cellules endothéliales
- 6- Formation de la lumière capillaire

# LES MECANISMES NECESSAIRES A LA MIGRATION CELLULAIRE



# u-PAR ET ADHESION CELLULAIRE

## INTERACTION DIRECTE AVEC LA VITRONECTINE

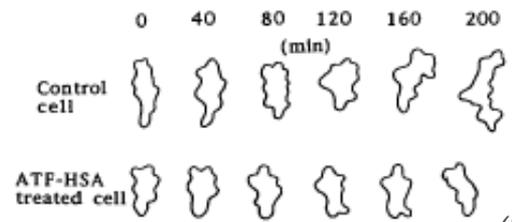
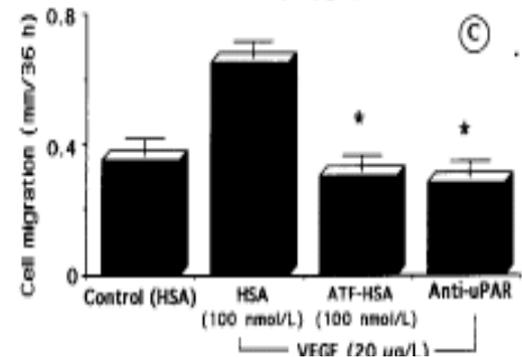
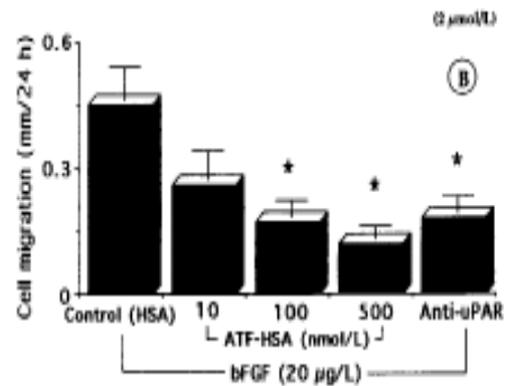


### - VITRONECTINE :

- Glycoprotéine de 75 kDa (1/3 de sucres)
- Présente dans la MEC et le plasma
- Organisée en 3 domaines
- Domaine N-terminal (1-39) lie le PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*) et l'u-PAR
- Séquence RGD (45-47) permet de fixer les intégrines ⇒ fixation des cellules à la MEC

# IMPORTANCE DE L'INTERACTION u-PA/u-PAR DANS LA MIGRATION DES CELLULES ENDOTHELIALES ET LA NEOANGIOGENESE TUMORALE

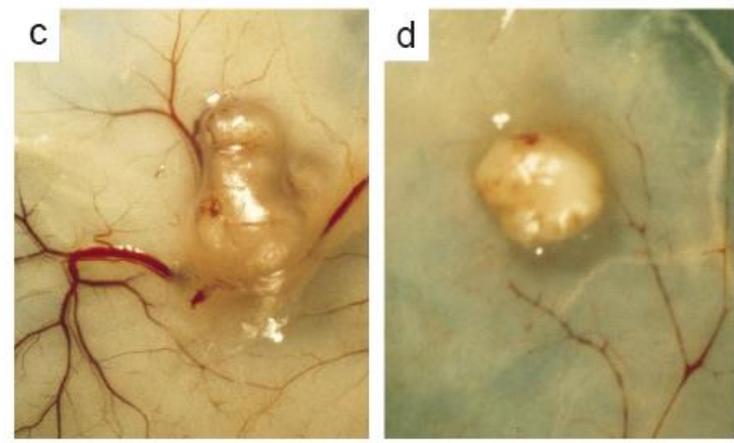
- Le fragment amino terminal de l'u-PA (ATF) couplé a l'albumine bloque la migration des CE



**Blocage la déformabilité des cellules endothéliales**

(Li et al., FEBS Lett. 1996)

- Un adénovirus produisant de l'ATF bloque l'angiogénèse tumorale



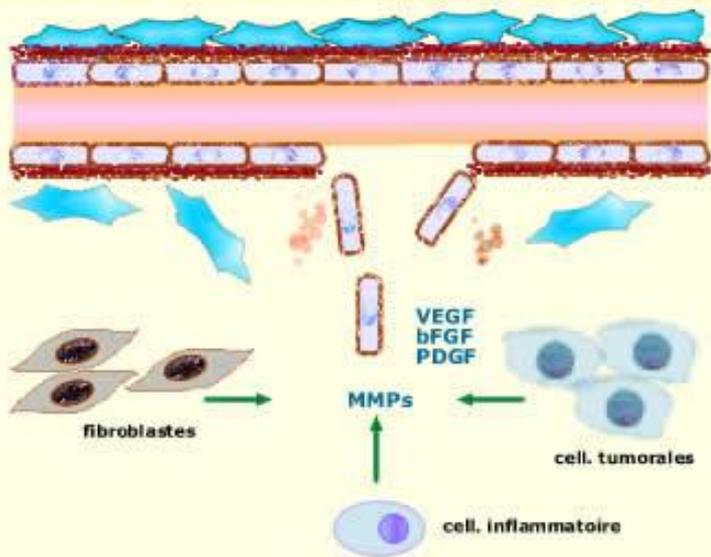
Témoin + AdmATF (J20)

**Xénogreffe de MDA-MB-231 chez la souris Nude**

(Li et al., Gene Ther. 1998)

# MIGRATION CELLULAIRE ET ANGIOGÉNÈSE

## Les premières étapes de l'angiogenèse



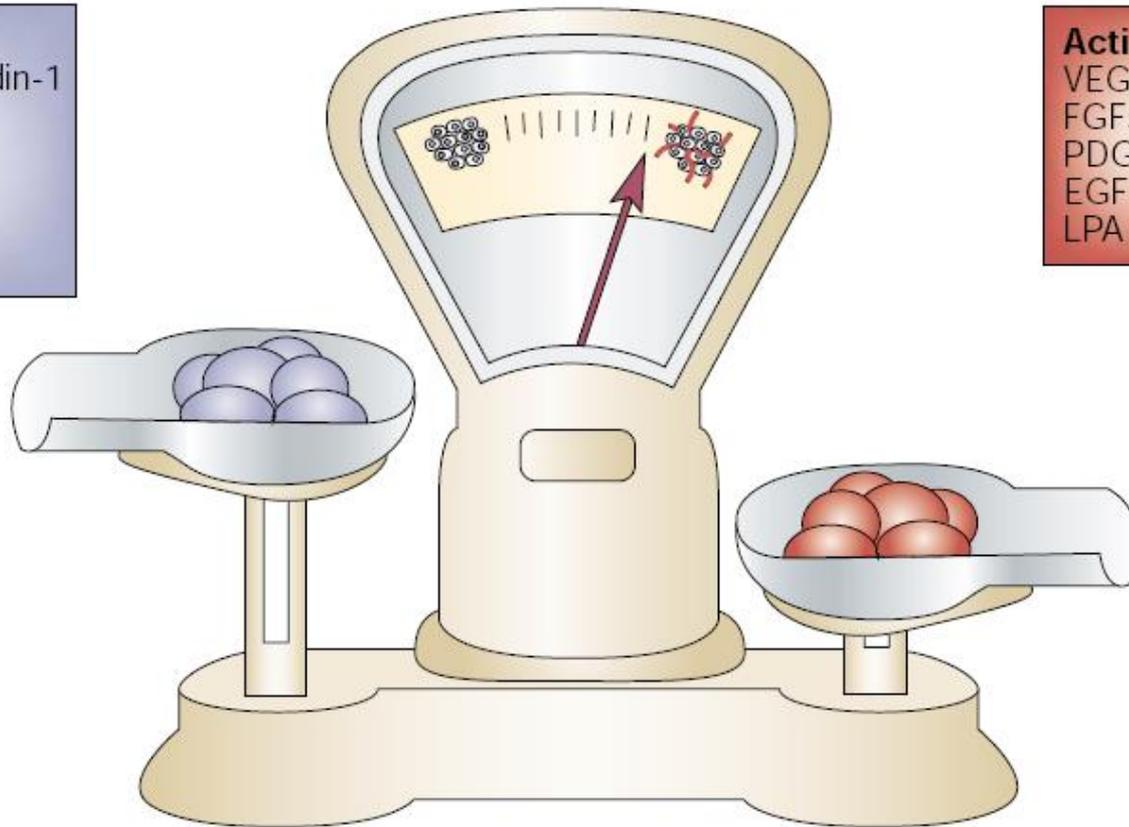
1. Détachement des péricytes
2. Dégradation de la membrane basale vasculaire (MBV)
3. Migration et prolifération des cellules endothéliales

Les phases d'initiation de l'angiogenèse:

- 1- Augmentation de la perméabilité vasculaire et dépôt extravasculaire de fibrine (VEGF)
- 2- Dissociation de la structure du vaisseau (MMP)
- 3- Dégradation de la membrane basale
- 4- Migration des cellules endothéliales et invasion de la MEC
- 5- **Prolifération des cellules endothéliales**
- 6- Formation de la lumière capillaire

# L'ANGIOGENESE RESULTE D'UN EQUILIBRE ENTRE ACTIVATEURS ET INHIBITEURS

**Inhibitors:**  
Thrombospondin-1  
*The statins:*  
Angiostatin  
Endostatin  
Canstatin  
Tumstatin



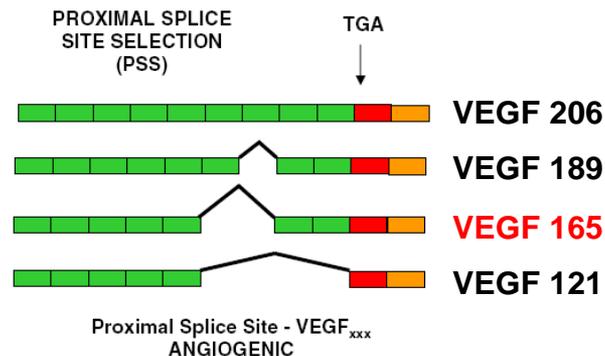
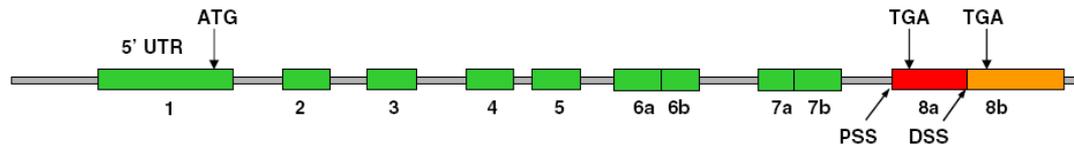
**Activators**  
VEGFs  
FGFs  
PDGFB  
EGF  
LPA

# LES PRINCIPAUX FACTEURS DE CROISSANCE ANGIOGENIQUES

- Famille du *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)
- Famille du *Fibroblast Growth Factor* (FGF)
- Les angiopoïétines
- Famille du *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF)
- Le *Tumour Growth Factor* -  $\beta$  (TGF-  $\beta$ )

# PRINCIPALES CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DES MOLECULES DE LA FAMILLE DU VEGF

	EC proliferation	EC migration	Vascular permeability	Angiogenesis	Lymphangiogenesis
VEGF-A	+	+	+	+	+,- <sup>(1)</sup>
VEGF-B	-	ND	-	+,- <sup>(1)</sup>	-
PlGF	-	+	-	+ <sup>(2)</sup>	ND
VEGF-C	+	+	+	+ <sup>(2)</sup>	+
VEGF-D	+	+	-	+ <sup>(3)</sup>	+
viral VEGF (VEGF-E)	+	+	+	+	ND
VEGF-F <sub>1</sub> <sup>(4)</sup>	+	ND	+	+	ND
VEGF-F <sub>2</sub> <sup>(5)</sup>	+	+	+	+	ND

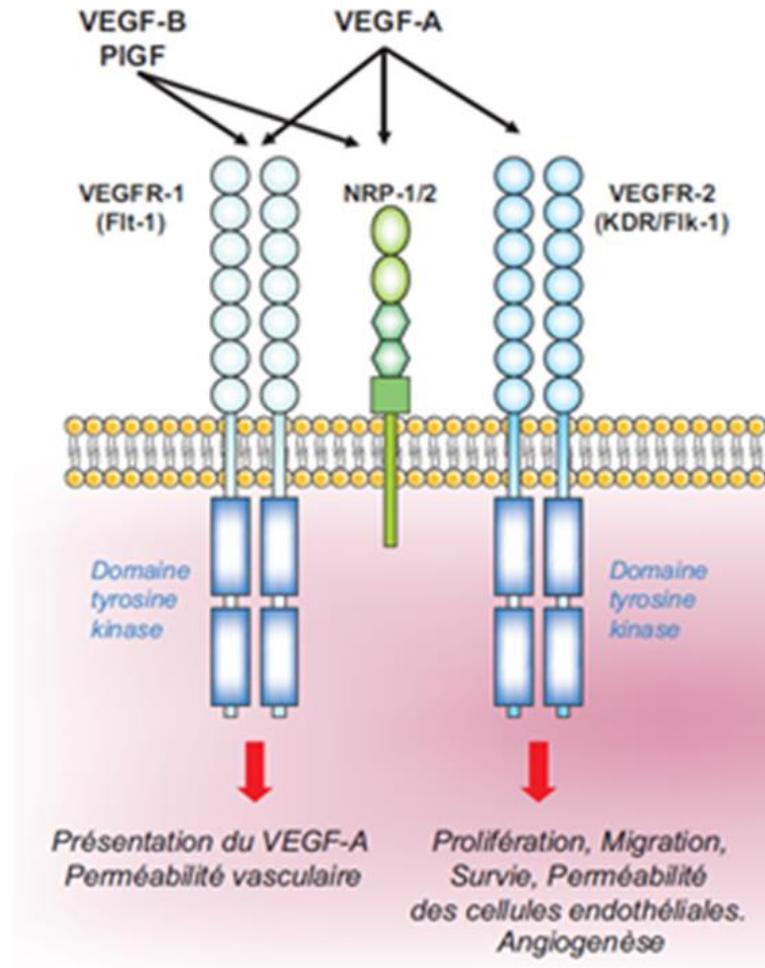


## Isoformes du VEGF A

- 189: la plus puissante
- 165: la plus abondante
- 121 : ne se lie pas à l'héparine

# LES RECEPTEURS DU VEGF

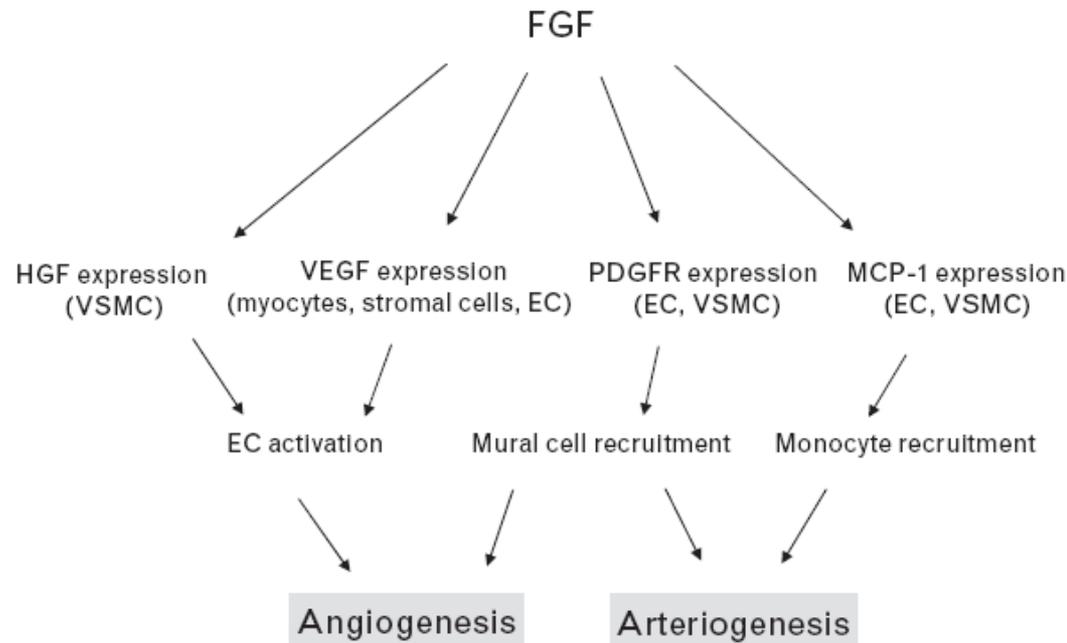
**Neuropilines :**  
(NRP 1 et 2)  
corécepteurs,  
potentialisent  
les interactions  
VEGF/VEGF-R



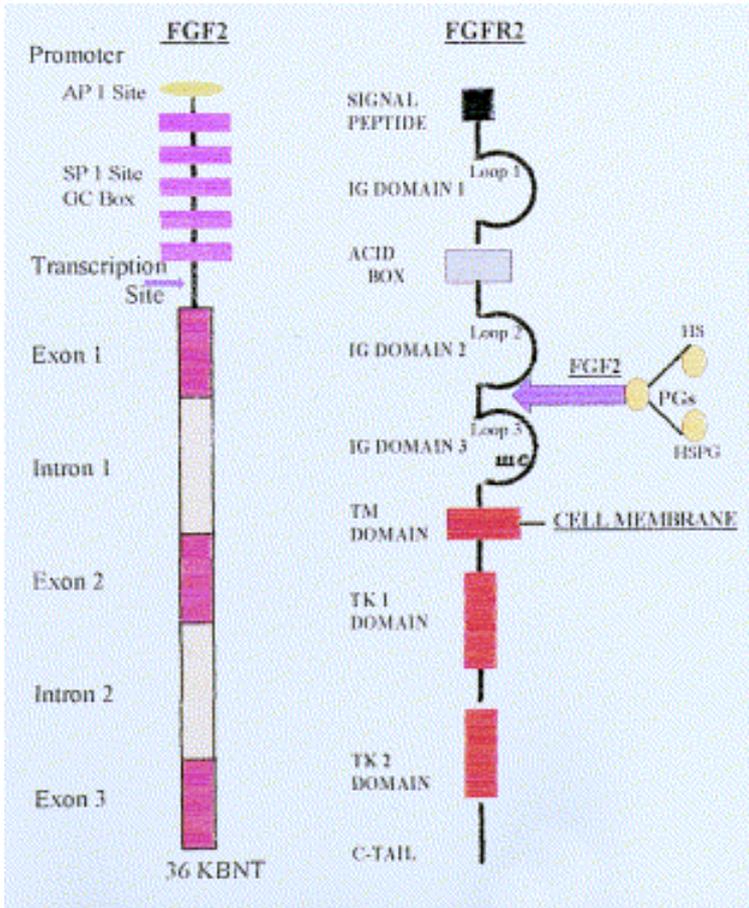
**VEGF-R3:**  
essentiellement  
sur les CE des  
vaisseaux  
lymphatiques

# LA FAMILLE DU *FIBROBLAST GROWTH FACTOR*

- Famille comprenant 22 membres
- Peptides de 17 à 34 kDa, 6 AA en commun, 22 AA fortement conservés
- Certains ont une forte affinité pour l'héparine (FGF-2)
- Le FGF-2 (*basic FGF* = bFGF) n'a pas de peptide de sécrétion (⇒ action paracrine)
- « chef d'orchestre » des autres facteurs angiogéniques

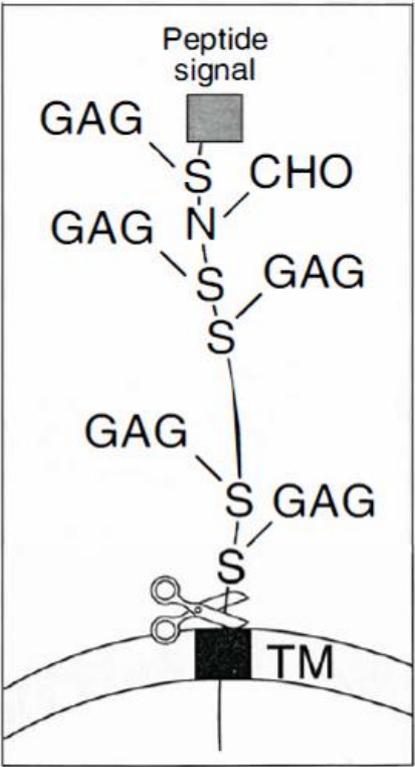


# LE *basic* FIBROBLAST GROWTH FACTOR (FGF-2)

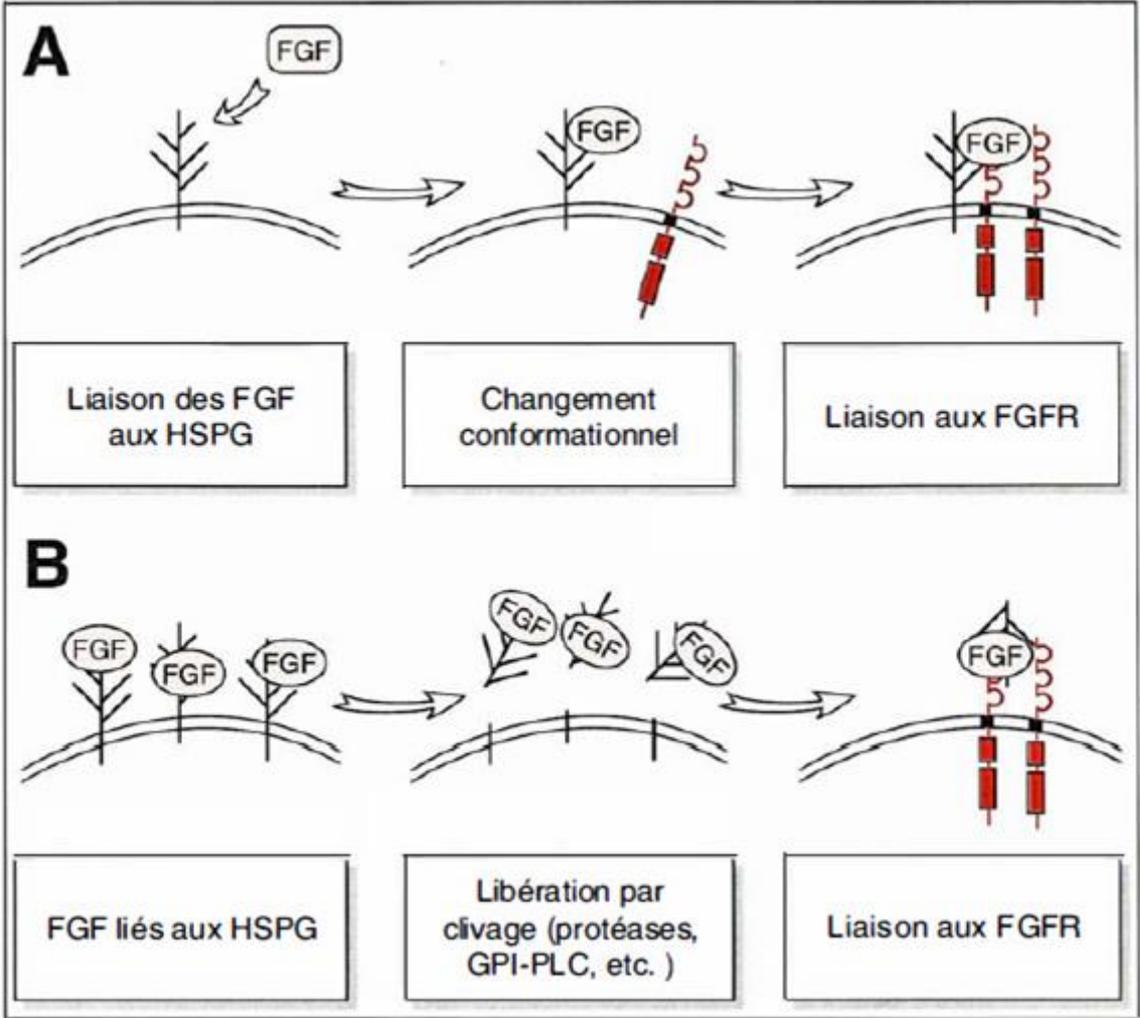


- MM de 18 kDa (formes de 22, 22.5 et 24 kDa)
- Pas de peptide signal de sécrétion
- Ne passe pas par le reticulum endoplasmique ni l'appareil de Golgi
- Libéré hors de la cellule par exocytose ou des lésions cellulaires
- Se fixe sur les GAG de la MEC
- Induit la prolifération, la migration et la différenciation des cellules cibles
- Effet plus net si GAG à la surface des cellules
- Présent en grande quantité dans le plasma ou les urines de patients atteints de cancer

# INTERACTIONS bFGF - GAG

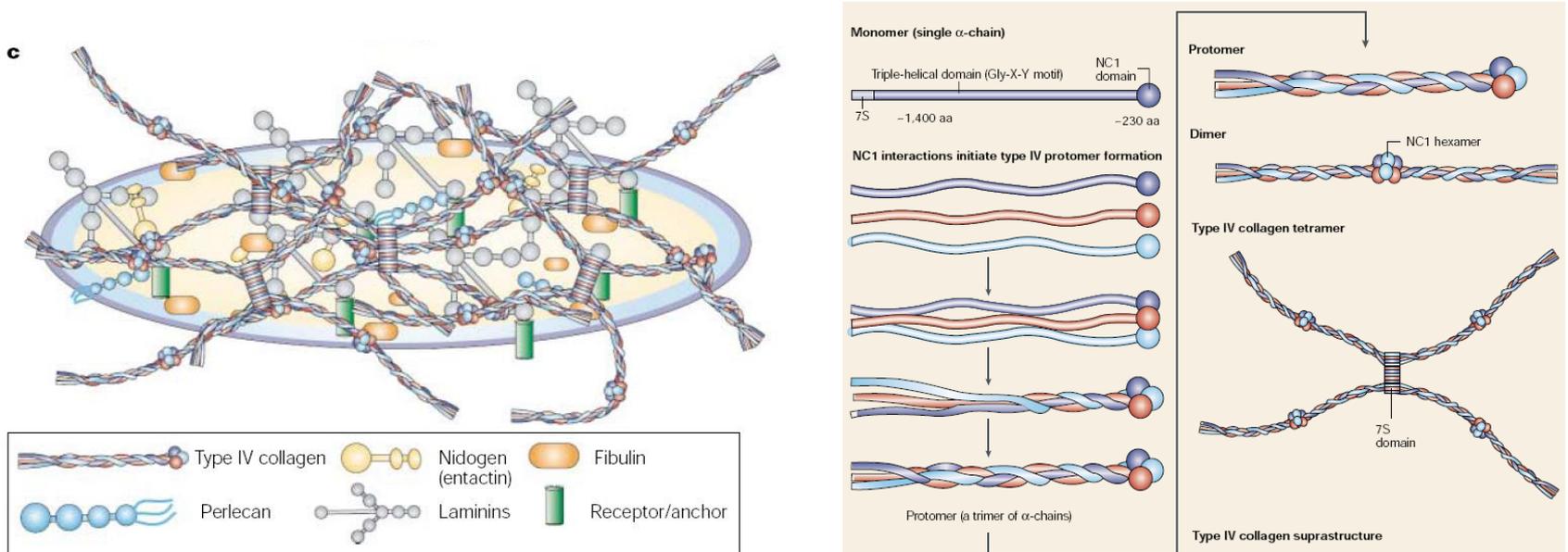


Le syndecan :  
Fixation du bFGF



# RÔLE DE LA MEMBRANE BASALE DANS L'ANGIOGENESE

- Structure amorphe de 50 à 100 nm, dans la partie basolatérale des tissus



(kalluri, Nature 2003)

- Dans les conditions physiologiques normales, la MB inhibe la prolifération des cellules endothéliales
- Composition variable en fonction des tissus  $\Rightarrow$  néoangiogénèse tumorale tissu dépendante, mais rôle prépondérant du collagène IV
- La dégradation en gel de la MB favorise la formation de capillaires (1938)

# INHIBITEURS D'ANGIOGENESE ISSUS DE LA MEMBRANE BASALE

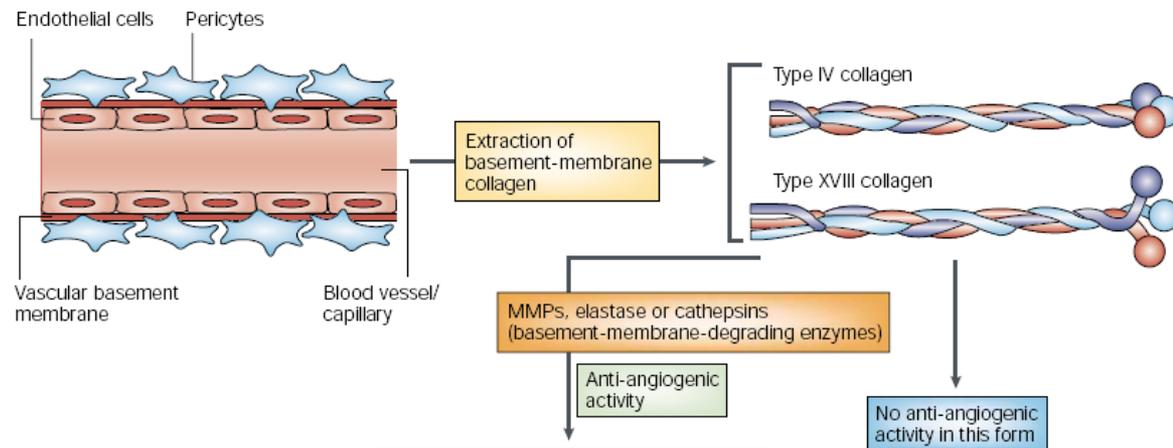
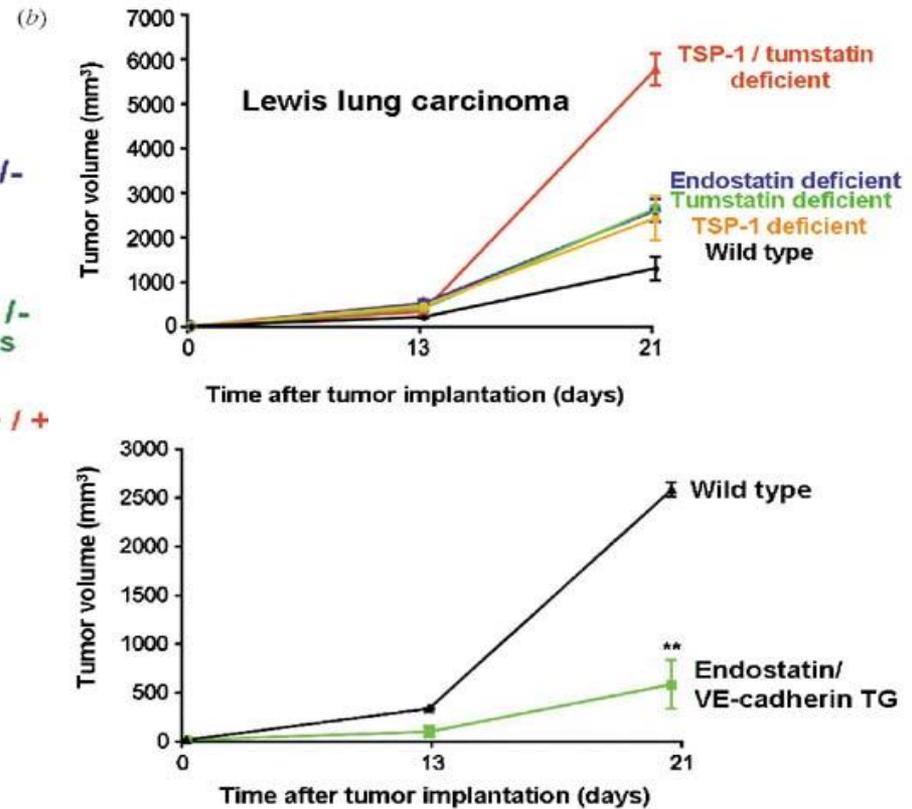
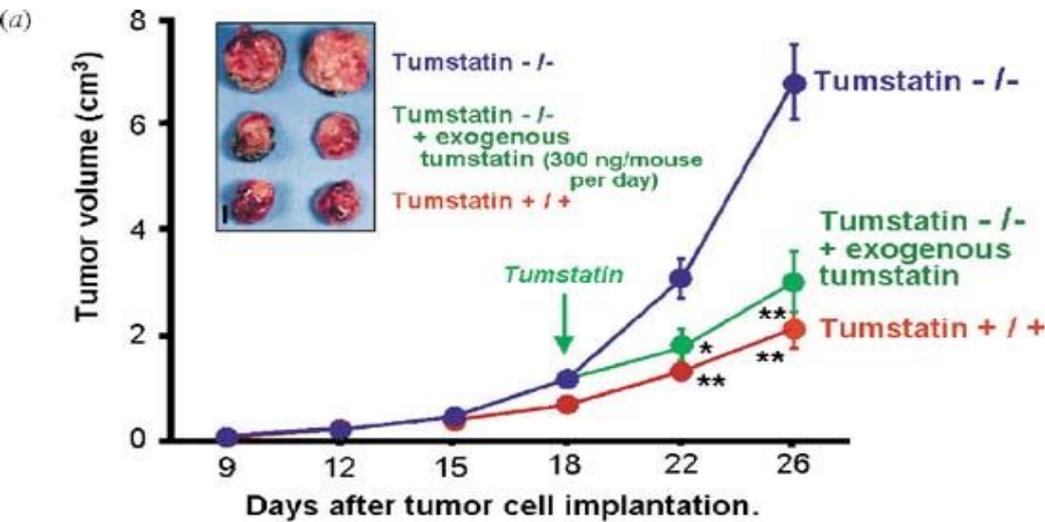


Table 1 | **Basement-membrane-derived angiogenesis inhibitors**

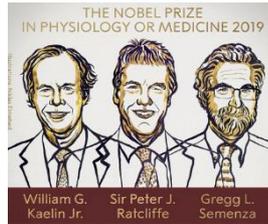
Angiogenesis inhibitor	Parent protein	Domain	Activity <i>EC proliferation inhibition</i>	<i>EC migration inhibition</i>	<i>EC apoptosis inhibition</i>	<i>Tumour inhibition</i>	Receptors
<u>Human endostatin</u>	$\alpha 1$ chain of type XVIII collagen	NC1 domain	No	Yes	Yes	Yes	$\alpha 5\beta 1$ integrin, tropomyosin
Human endostatin-like protein	$\alpha 1$ chain of type XV collagen	NC10 domain	Yes	Yes	NA	Yes	NA
Arrestin	$\alpha 1$ chain of type IV collagen	NC1 domain	Yes	Yes	Yes	Yes	$\alpha 1\beta 1$ integrin
Canstatin	$\alpha 2$ chain of type IV collagen	NC1 domain	Yes	Yes	Yes	Yes	NA
Tumstatin	$\alpha 3$ chain of type IV collagen	NC1 domain	Yes	No	Yes	Yes	$\alpha v\beta 3$ integrin
$\alpha 6(IV)$ NC1 domain	$\alpha 6$ chain of type IV collagen	NC1 domain	Yes	NA	NA	NA	NA

EC, endothelial cell; NA, data not available; NC1, non-collagenous domain; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor-2.

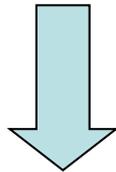
# UN DEFICIT EN INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE INDUIT LA CROISSANCE TUMORALE



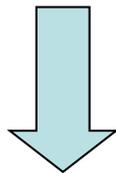
# LE SWITCH ANGIOGENIQUE : RÔLE DU HIF



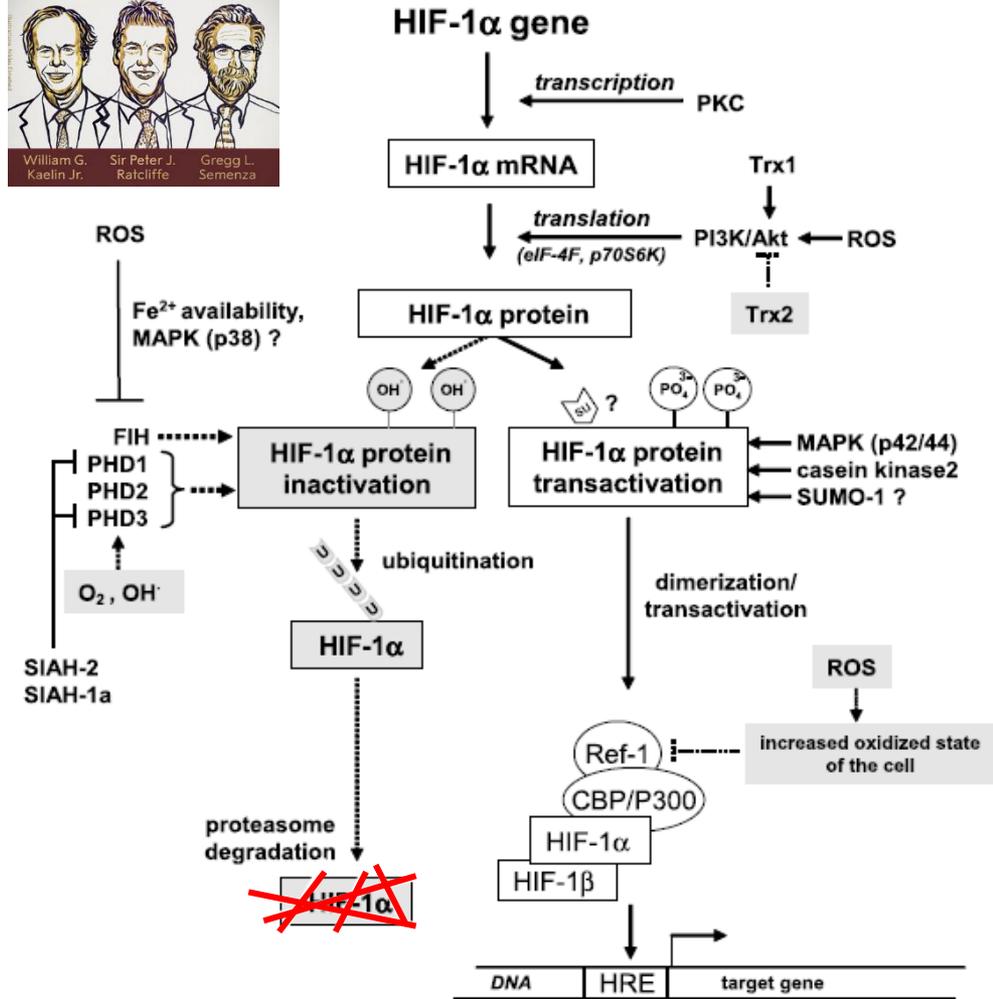
Cellule en hypoxie



Stabilisation de HIF1α



Sécrétions de facteurs  
angiogéniques

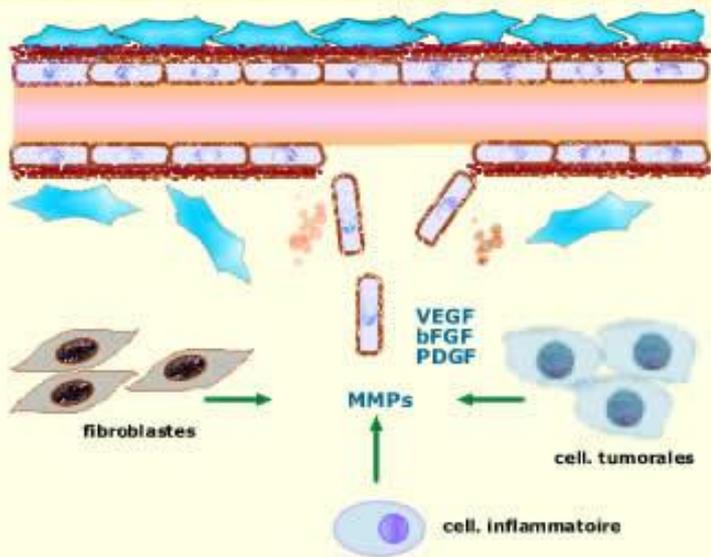


# PRINCIPAUX FACTEURS REGULES PAR LE «HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR- $\alpha$ »

HIF target gene (HRE dependent)	HIF target gene (unknown mechanism)	HIF-1 $\alpha$ /protein interaction	Effects
VEGF			Angiogenesis, arteriogenesis, proliferation, migration vascular permeability, vessel sprouting
	PLGF		Proliferation, angiogenesis
VEGFR1			Vascular permeability
VEGFR2			Proliferation, survival, chemotaxis, vascular permeability, vessel sprouting
eNOS			Vasodilation, permeability
iNOS			Vasodilation
	Ang1?		Pericyte recruitment, vessel stabilization
	Ang2		Vessel sprouting, pericyte loss
	Tie2 ?		Vessel stabilization, sprouting
	PDGF-B		Proliferation, migration recruitment of pericyte and SMC
		Notch	Vessel stabilization, growth arrest, pericyte recruitment, contact inhibition
	DLL4		Vessel stabilization, growth arrest, pericyte recruitment, contact inhibition
	Ephrin (A1, B2)		Intercellular signaling during vessel formation
	Eph-receptor (EphA2 and EphB4)		Intercellular signaling during vessel formation
Matrix metalloproteinase MT1			Extracellular matrix metabolism
TIMP-1			Extracellular matrix metabolism
Collagen 4-prolyl-hydroxylase			Extracellular matrix metabolism

# MIGRATION CELLULAIRE ET ANGIOGÉNÈSE

## Les premières étapes de l'angiogenèse

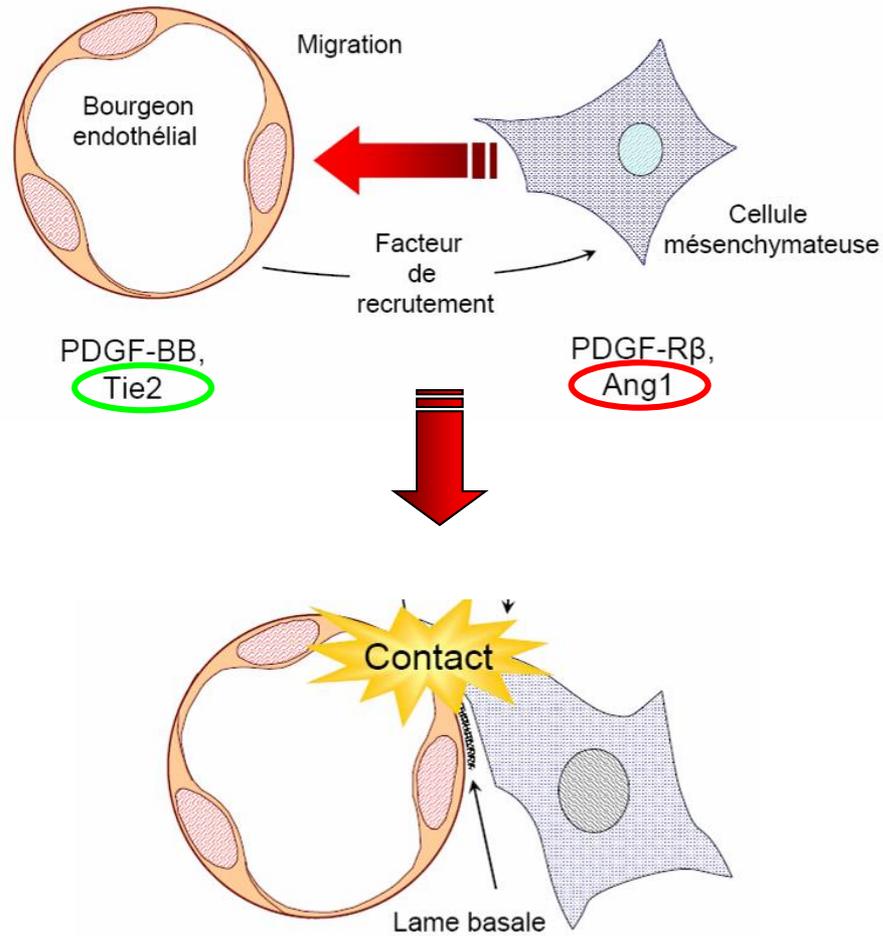


1. Détachement des péricytes
2. Dégradation de la membrane basale vasculaire (MBV)
3. Migration et prolifération des cellules endothéliales

Les phases d'initiation de l'angiogenèse:

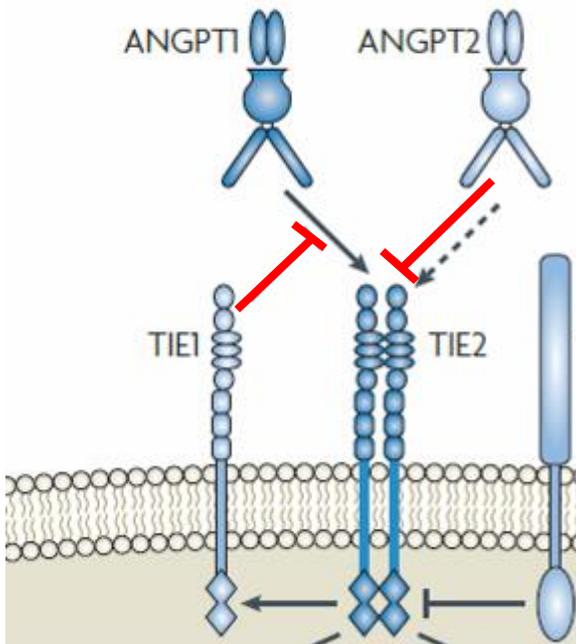
- 1- Augmentation de la perméabilité vasculaire et dépôt extravasculaire de fibrine (VEGF)
- 2- Dissociation de la structure du vaisseau (MMP)
- 3- Dégradation de la membrane basale
- 4- Migration des cellules endothéliales et invasion de la MEC
- 5- Prolifération des cellules endothéliales
- 6- **Formation de la lumière capillaire**

# RECRUTEMENT DES PERYCITES



# LES ANGIOPOÏÉTINES

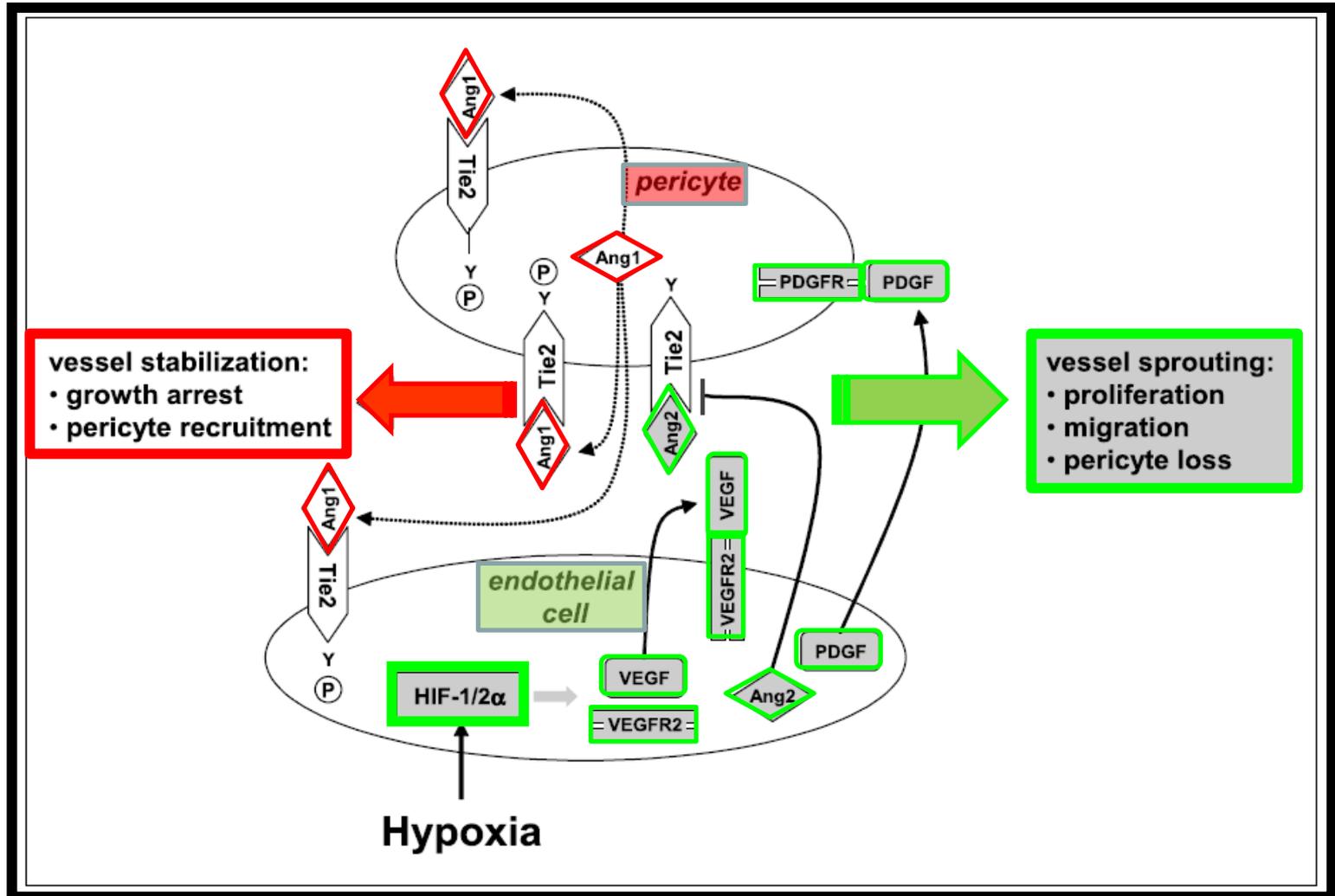
- Agissent de concert avec le VEGF
- 3 ANGPT décrites (1, 2, 4)
- 2 récepteurs Tie-1 et -2 : (pas de ligand connu pour Tie-1....)



(Huang *et al.*, *Mol Integ Physiol*, 2010)

- **ANGPT1** : sécrétée par fibroblastes, cellules endothéliales (CE)  $\Rightarrow$  Tie-2  $\Rightarrow$  déposition de la membrane basale, recrutement des péricytes
- **ANGPT2** : sécrétée par les CE sous effet du VEGF, PDGF, IGF....  
compétition pour la fixation sur Tie-2, inhibe la signalisation de l'ANGPT-1

# REGULATION COORDONNEE DE LA PROLIFERATION ENDOTHELIALE ET DE LA STABILISATION DU VAISSEAU PAR LES PERICYTES



# CONCLUSION

- L'angiogenèse est un processus finement régulé, dépendant de nombreux facteurs solubles, mais aussi de la composition du microenvironnement
- La redondance des molécules régulant l'angiogenèse explique possiblement cette efficacité modérée ⇒ intérêt d'identifier de nouvelles cibles (u-PAR, molécules d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales, enzymes du métabolisme de la cellule endothéliale...)
- Le renforcement des néo-vaisseaux irriguant la tumeur constitue un autre axe de recherche. En effet, la stabilisation des vaisseaux à structure « anarchique » permettrait une meilleure diffusion des chimiothérapies au sein de la tumeur.
- La modulation pharmacologique de l'angiogenèse pourrait être un axe stratégique important, cependant l'inhibition de l'angiogenèse (dépendant du VEGF) donne des résultats modestes, avec des effets secondaires.