



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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

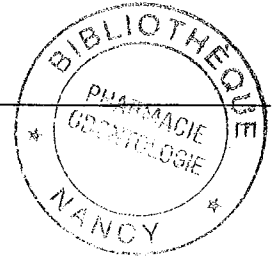
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

T/PH/N/2007/959

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2007



FACULTE DE PHARMACIE

**Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires
impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale :
nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie**

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

le 08 octobre 2007

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Claire BRAUER**
née le 06 novembre 1981 à Thionville (57)

Membres du Jury

Président :	M. Jean-Louis MERLIN	Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy
Juges :	Mme Béatrice FAIVRE	Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy
	Mme Catherine VALLANCE	Pharmacien Hospitalier, Centre Alexis Vautrin, Nancy
	Mr Michel AULOGE	Pharmacien d'Officine, membre invité

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 076660 9

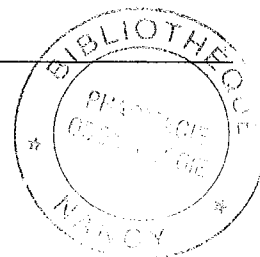
PPN 119465413

BIB 189168

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2007

FACULTE DE PHARMACIE



**Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires
impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale :
nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie**

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

le 08 octobre 2007

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Claire BRAUER**
née le 06 novembre 1981 à Thionville (57)

Membres du Jury

Président :	M. Jean-Louis MERLIN	Professeur, Faculté de Pharmacie, Nancy
Juges :	Mme Béatrice FAIVRE	Maître de Conférences, Faculté de Pharmacie, Nancy
	Mme Catherine VALLANCE	Pharmacien Hospitalier, Centre Alexis Vautrin, Nancy
	Mr Michel AULOGE	Pharmacien d'Officine, membre invité

FACULTE DE PHARMACIE - UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1
Membres du personnel enseignant 2006/2007

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 Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

M^{lle} BESSON Suzanne

M^{lle} GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MIRJOLET Marcel

M. MORTIER François

M. PIERFITTE Maurice

M. SCHWARTZBROD Louis

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

M^{me} FUZELLIER Marie-Claude

M^{lle} IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

M^{me} POCHON Marie-France

M^{me} ROVEL Anne

M^{me} WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

M. BLOCK Jean-Claude

M^{me} CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

M^{me} FINANCE Chantal

M^{me} FRIANT-MICHEL Pascale

M^{lle} GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

M. LALLOZ Lucien

M^{me} LARTAUD Isabelle

M^{me} LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Chimie organique

Pharmacologie

Pharmacognosie

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique
M.	REGNOUF de VAINS Jean-Bernard	Chimie thérapeutique
M.	RIHN Bertrand	Biochimie
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie, parasitologie
M.	SIMON Jean-Michel	Economie de la santé, législation pharmaceutique
M.	VIGNERON Claude	Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie – virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Communication et santé
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	BOURRA Cédric	Physiologie
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, organisation animale
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique, mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
Mme	Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique
M.	François DUPUIS	Pharmacologie
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Informatique, biostatistiques
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mle	MARCHAND Stéphanie	Chimie physique
M.	MEHRI-SOUSSI Faten	Hématologie biologique
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MERLIN Christophe	Microbiologie environnementale et moléculaire
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAPIN Anne	Pharmacie galénique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
M.	ZAIYOU Mohamed	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR AGREGE

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

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 instruit 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 couvert d'opprobre et méprisé 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



Au terme de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui m'ont soutenue et aidée à réaliser cette thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Jean-Louis Merlin pour m'avoir proposé ce sujet qui a su piquer mon intérêt, et pour avoir bien voulu me guider tout au long de ce travail.

Je voudrais également remercier mesdames Béatrice Faivre et Catherine Vallance, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci à monsieur Michel Auloge pour avoir accepté d'une part de participer au jury, et d'autre part pour m'avoir accordé sa confiance au début de ma vie professionnelle.

Un grand merci également :

A mes parents, et à mon frère Mathieu, pour leurs encouragements, leur soutien inébranlable, mais surtout pour leur confiance et leur compréhension...

A Rodolphe, pour sa présence et sa patience, sans oublier l'aventure qui nous attend !

A mes amies de collège, Laurence et Sabrina, pour nos soirées « entre filles », et pour leur amitié depuis toutes ces années ; en espérant que le temps ou la distance ne l'entachent jamais.

A mes amies de pharma, Emilie et Audrey, pour leur amitié et les soirées mémorables passées en leur compagnie, dont une certaine de novembre 2006... !

A Pat, pour les heures passées allongé sur mon bureau à me soutenir à sa façon !

Enfin, ma pensée va naturellement vers mes grands-parents, présents ou disparus, pour leur affection et leurs encouragements.

LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES

-A-

AFSSAPS : agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AMM : autorisation de mise sur le marché
ANAES : agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé
Ang1 : angiopoïétine 1
AngII : angiotensine 2
AP-1 : activating protein 1
APC : adenomatous polyposis coli
ASCO : american society of clinical oncology
ATF : amino-terminal fragment
AT1R : récepteur de type 1 de l'angiotensine II ; AT2R : récepteur de type 2 de l'AngII
ATP : adénosine triphosphate

-B-

BAD : Bcl-xL/Bcl-2-associated death promoter
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2

-C-

CaLB : calcium lipid binding
CBP : CREB-binding protein
CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules
CD : cluster de différenciation
CDK : cyclin dependent kinase
CDT6 : cornea-derived transcript 6
CEC : cellules endothéliales circulantes
CEP : progéniteurs des cellules endothéliales

-D-

DAG : diacylglycérol
DCE-MRI : dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging
Dkk : dickkopf
Dl14 : Delta-like 4
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMT : dose maximale tolérée
Dsh : Dishevelled

-E-

EBS : Ets binding site
ECA : enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group
EGF : epidermal growth factor
Eph : récepteur aux éphrines
EPO : érythropoïétine
ERK : extracellular signal-regulated kinase
ET : endothéline
ETA-R : récepteur de type A de l'endothéline ; ETB-R : récepteur de type B de l'endothéline

-F-

5FU : 5 fluoro-uracile
FAK : focal adhesion kinase

FAT : focal adhesion targeting
FDA : food and drug administration
FGF : fibroblast growth factor
FGF BP-1 : FGF binding protein 1
FGFR : récepteur du FGF
Flk-1/KDR : fetal liver-kinase 1/ kinase domain-containing receptor
Flt-1 : fms-like tyrosine kinase-1 = VEGFR-1
FPP : farnesyl diphosphate
FRNK : FAK-related non-kinase
FRB : *FKBP-RAP binding*
FRZ : frizzled
FTI : inhibiteur de la farnésyltransférase

-G-

GAP : GTPase activating protein
GDP : guanosine diphosphate
Gd-DTPA : Magnévis
GH : growth hormone
GIST : gastro-intestinal stromal tumor
GPI : glycosyl phosphatidyl inositol
Grb2 : growth factor receptor bound 2
GSK3 : glycogen synthase kinase 3
GTP : guanosine triphosphate

-H-

HER : human epithelial growth factor
HIF : hypoxia-induced factor
HPM FGF : FGF de haut poids moléculaire
HRE : hypoxia responsive element
HSP : heat shock protein
HTA : hypertension artérielle

-I-

IC : indice de confiance
ICAM : intracellular adhesion molecule
iECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I
IFL : irinotécan + 5FU + acide folinique
IFN : interféron
Ig : immunoglobuline
IGF : insulin-like growth factor
IL : interleukine
IP3 : inositol triphosphate
IP4 : inositol tétraphosphate
IRS : insulin receptor substrate
ITT : intention de traiter

-J-

JAK : janus kinase
JH : JAK homology
JNK : c-Jun N-terminal kinase

-L-

LDL : low-density lipoprotein
LEF/TCF : lymphoid enhancer factor/ T-cell factor
LRP : LDL related protein
LV : leucovorine

-M-

MAPK : mitogen-activated protein kinase = ERK
MAPKK : MAPK kinase = MEK
MAPKKK : MAPKK kinase = MEKK
MEC : matrice extra-cellulaire
MMP : matrix metalloproteinase
MMTV : mouse mammary tumor virus
MSP : macrophage stimulating protein
MT-MMP : membrane-type matrix metalloproteinase
mTOR : mammalian target of rapamycin
MVD : densité en microvaisseaux

-N-

NFκB : nuclear factor kappa B
NO : monoxide d'azote
NRP : neuropiline

-P-

PA : plasminogen activator
PAI : plasminogen activator inhibitor
PDECGF : platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF : platelet-derived growth factor
PDK : phosphoinositide-dependent kinase
PEX : fragment hémopexine
PET-scan : tomographie par emission de positrons
PF4 : facteur plaquettaire 4
PH : pleckstrin-homology
PHD : prolyl-hydroxylase domain-containing enzyme
PI : phosphatidylinositol
PIAS : protein inhibitor of activated STAT
PI3K : phosphatidylinositol-3 kinase
PIKK : phosphatidylinositol-3 kinase like-kinase
PIP2 : phosphatidylinositol diphosphate
PIP3 : phosphatidylinositol triphosphate
PKA : protéine kinase A
PKB : protéine kinase B = AKT
PKC : protéine kinase C
PLC : phospholipase C
PIGF : placenta growth factor
Pro : proline
PTB : phosphotyrosine binding
PTEN : phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10

-R-

RACK : receptors for activated C kinase
rasGAP : ras GTPase activating protein

RCPG : récepteurs couplés aux protéines G
RECK : reversion-including cystein rich protein with kazal motifs
RGD : séquence arginine-glycine-acide aspartique
RO : réponse objective
RTK : récepteur tyrosine kinase
RTPCR : reverse transcription polymerase chain reaction

-S-

SEMA3F : sémaphorine 3F
Ser/Thr : sérine/thréonine
siRNA : small interfering RNA
SFRP : Secreted Frizzled-related protein
sFRP : frizzled-related proteins
SG : survie globale
SH : src homology
SHP-1 : Src homology phosphatase-1
SSP : survie sans progression
STAT : signal transducer and activator of transcription
suPAR : soluble urokinase plasminogen activator receptor

-T-

TGF : transforming growth factor β
Thr : Thréonine
Tie : tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
TKI : inhibiteur des tyrosine kinases
TNF : tumor necrosis factor
TP : thymidine phosphorylase
tPA : tissue plasminogen activator
TRP : transient receptor potential
TSP : thrombospondine
Tyr : tyrosine

-U-

uPAR : urokinase plasminogen activator receptor
uPA : urokinase plasminogen activator

-V-

VCAM : vascular cell adhesion molecule
VE-cadhérine : vascular endothelial cadhérine
VEGF : vascular endothelial growth factor
VEGFR : vascular endothelial growth factor receptor
VHL : von Hippel-Lindau
VPF : vascular permeability factor

-W-

WIF1 : Wnt inhibitory factor-1
WISP : Wnt-induced secreted protein



TABLE DES MATIÈRES

1^{ERE} PARTIE : L'ANGIOGENESE.....	2
1.1) Physiopathologie de l'angiogenèse	4
1.1.1) <i>Angiogenèse physiologique</i>	4
1.1.2) <i>Angiogenèse pathologique</i>	5
1.1.2.1) Cancer	5
1.1.2.1.1) Angiogenèse et croissance tumorale	5
1.1.2.1.2) Angiogenèse et dissémination métastatique	6
1.1.2.2) Autres pathologies.....	7
1.1.2.2.1) Rétinopathie diabétique.....	7
1.1.2.2.2) Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	7
1.1.2.2.3) Polyarthrite rhumatoïde.....	8
1.1.2.2.4) Athérosclérose.....	8
1.2) L'angiogenèse tumorale : un enjeu thérapeutique dans le traitement du cancer	9
1.2.1) <i>Structure des vaisseaux issus de l'angiogenèse tumorale vs vaisseaux normaux</i>	9
1.2.1.1) Sur le plan structurel	9
1.2.1.2) Sur le plan physiologique.....	11
1.2.1.2.1) Périphérie	11
1.2.1.2.2) Centre	11
1.2.1.2.3) Métastases	12
1.2.2) <i>Avantages des cellules endothéliales comme cibles anti-cancéreuse</i>	12
1.2.2.1) Accessibilité.....	12
1.2.2.2) Stabilité génétique.....	13
1.2.2.3) Large panel de cancers concernés	15
1.2.2.4) Marqueurs spécifiques	15
1.2.2.5) Moins d'effets secondaires.....	15
1.2.2.6) Possibilité d'associations avec des thérapeutiques existantes	15
1.2.2.7) Autres.....	15
2^{EME} PARTIE : MECANISMES REGISSANT L'ANGIOGENESE.....	17
2.1) Déroulement de l'angiogenèse	17
2.2) Acteurs et voies de signalisation mis en jeu et rôle au sein de l'angiogenèse tumorale	19
2.2.1) <i>Acteurs de l'angiogenèse tumorale</i>	19
2.2.1.1) Acteurs de la dégradation de la MEC.....	20
2.2.1.1.1) Le système uPAR/uPA	21
2.2.1.1.2) Les MMPs (matrix metalloproteinases)	23
2.2.1.1.3) Relations entre les deux systèmes protéasiques uPAR/uPA et MMPs	26
2.2.1.2) Acteurs pro-angiogènes.....	27
2.2.1.2.1) Le système du VEGF	28
2.2.1.2.2) Angiopoïétines	39
2.2.1.2.3) FGF	41
2.2.1.2.4) Autres	43
2.2.1.3) Acteurs anti-angiogènes	51
2.2.1.3.1) Famille des thrombospondines	52
2.2.1.3.2) Angiostatine et endostatine.....	53
2.2.1.3.3) Autres	54
2.2.1.4) Acteurs du déclenchement de l'angiogenèse : le switch angiogénique.....	55
2.2.1.5) Acteurs des interactions cellules/MEC.....	59
2.2.1.5.1) Les intégrines	59
2.2.1.5.2) FAK.....	60
2.2.2) <i>Voies de signalisation intracellulaire</i>	65
2.2.2.1) Voie de la PI3Kinase.....	72
2.2.2.1.1) PI3 kinases.....	73
2.2.2.1.2) PDK1	73
2.2.2.1.3) Kinases AKT	74

2.2.2.1.4) mTOR.....	74
2.2.2.2) Voie de la phospholipase C.....	75
2.2.2.2.1) Phospholipase C.....	75
2.2.2.2.2) Inositol triphosphate.....	75
2.2.2.2.3) Diacylglycérol et Protéine Kinase C.....	76
2.2.2.3) Voie Ras/Raf/MAPK.....	78
2.2.2.3.1) Module ERK.....	79
2.2.2.3.2) Module P38 MAPK.....	81
2.2.2.3.3) Module JNK.....	81
2.2.2.4) Voie JAK/STAT.....	82
2.2.2.5) Voie Wnt.....	84
2.2.2.5.1) Voie wnt canonique :.....	85
2.2.2.5.2) Voies Wnt non canoniques.....	87
2.2.2.6) La voie Delta/Notch.....	87

3^{EME} PARTIE : STRATEGIES ANTI-ANGIOGENIQUES 91

3.1) Les thérapies moléculaires ciblées : généralités.....	91
3.1.1) Définition.....	91
3.1.2) Le concept de normalisation vasculaire.....	94
3.2) Stratégies en rapport avec les voies de transduction du signal.....	95
3.2.1) La voie de signalisation PI3K-AKT.....	95
3.2.1.1) Inhibiteurs non spécifiques de la voie PI3K.....	95
3.2.1.2) Inhibiteurs de mTOR.....	96
3.2.2) La voie de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK dans le traitement du cancer.....	99
3.2.2.1) Inhibiteurs de la farnésyltransférase.....	99
3.2.2.2) Inhibiteurs de RAF.....	101
3.2.2.3) Inhibiteurs de MEK.....	103
3.2.3) La voie JAK/STAT.....	104
3.2.4) La voie Wnt.....	105
3.3) Autres stratégies de thérapie ciblée.....	106
3.3.1) Inhibition de la liaison des facteurs angiogéniques à leurs récepteurs.....	106
3.3.1.1) Anti-VEGF.....	107
3.3.1.1.1) Les aptamers.....	107
3.3.1.1.2) Le VEGF-trap.....	107
3.3.1.1.3) Les anticorps monoclonaux.....	107
3.3.1.2) Anti-VEGFR.....	113
3.3.1.2.1) Ribozymes.....	113
3.3.1.2.2) Inhibiteurs des TK.....	113
3.3.1.2.3) Autres inhibiteurs du VEGFR en développement.....	121
3.3.2) Drogues qui inhibent la dégradation de la matrice.....	122
3.3.3) Drogues qui inhibent les fonctions des cellules endothéliales.....	123
3.3.3.1) Les interférons.....	123
3.3.3.2) La thalidomide et ses dérivés.....	123
3.3.3.3) Autres.....	124
3.3.4) Autres stratégies à l'étude.....	125
3.3.4.1) Système Angiotensine/Endothéline.....	125
3.3.4.2) Stratégie thérapeutique fondée sur la lactadhérine.....	127
3.3.5) Quantification de l'efficacité de ces thérapies.....	131
3.3.6) Durée optimale de traitement pour ces thérapies.....	134
3.4) Etat des lieux.....	138
3.4.1) Traitements anti-angiogènes déjà disponibles.....	138
3.4.2) Traitements anti-angiogènes en essais cliniques.....	142
3.4.3) Officine et chimiothérapies par voie orale.....	143
3.4.3.1) Suivi et surveillance.....	143
3.4.3.2) Comment assurer un conseil officinal de qualité en cancérologie ?.....	144
3.4.3.3) Quelles sont les particularités à gérer avec les chimiothérapies orales?.....	144
3.4.4) Les réseaux de santé en cancérologie.....	145



TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Vasculogenèse et angiogenèse.....	3
Figure 2 : Fiche signalétique de la cellule cancéreuse	5
Figure 3 : Analyse microscopique des différences structurelles entre vaisseaux sanguins normaux et angiogéniques.....	10
Figure 4 : Représentation schématique de l'architecture du réseau vasculaire normal, bien organisé ; et du réseau vasculaire tumoral, anormal et chaotique	10
Figure 5 : Evolution de l'expression des facteurs angiogéniques au cours de la progression du cancer du sein.....	13
Figure 6 : Angiogenèse bourgeonnante : schéma simplifié de son déroulement.....	17
Figure 7 : Les différentes classes de molécules intervenant au cours de l'angiogenèse.....	19
Figure 8 : Schéma simplifié du rôle des principaux acteurs mis en jeu dans l'angiogenèse	20
Figure 9 : Liens unissant les deux systèmes protéasiques uPAR/uPA et MMPs.....	27
Figure 10 : Représentation des isoformes du VEGF-A, issues de l'épissage alternatif.....	29
Figure 11 : Représentation schématique des différents récepteurs du VEGF, de leur profil d'expression ainsi que de leurs ligands respectifs.	34
Figure 12 : Signalisation intra-cellulaire induite par le VEGF via le VEGFR-2.....	36
Figure 13 : Les neuropilines, des récepteurs bifonctionnels	37
Figure 14 : Les différents facteurs de croissance endothéliaux vasculaires, leurs récepteurs et co-récepteurs ...	39
Figure 15 : Similitudes entre les étapes de synthèse de ET-1 et d'AngII, et modes d'action.....	44
Figure 16 : Principales voies de signalisation intracellulaire, couplées aux récepteurs de ET-1 et de AngII, impliquées dans la progression tumorale.....	46
Figure 17 : La lactadhérine interagit avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ pour activer le processus de néovascularisation	47
Figure 18 : Le switch angiogénique	56
Figure 19 : Le complexe d'adhérence focale	61
Figure 20 : Structure de FAK	61
Figure 21 : Les voies de signalisation de l'adhérence focale	63
Figure 22 : La voie PI3K-AKT-mTOR.....	72
Figure 23 : Les voies de signalisation intracellulaire induites par l'oncoprotéine Ras	78
Figure 24 : Structure des JAK et des STAT.....	82
Figure 25 : Régulation de la β -caténine dans la voie Wnt.....	86
Figure 26 : Modèle proposé pour le mécanisme d'action de Dll4/Notch	89
Figure 27 : Sites d'action envisageables sur la voie Wnt.....	105
Figure 28 : Différentes stratégies d'inhibition de la signalisation induite par le VEGF.....	106
Figure 29 : Mode d'action de l'AVASTIN®	108
Figure 30 : Stratégies ciblant les cellules endothéliales et non endothéliales dans le but d'inhiber l'angiogenèse tumorale	130
Figure 31 : Technique de repérage hot spot.....	133
Figure 32 : Apprentissage de la quantification en microvaisseaux.....	133

Tableau 1 : Différences fondamentales entre les vascularisations normales et tumorales	9
Tableau 2 : Facteurs pro-angiogéniques connus.....	28
Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques et structurales des isoformes du VEGF-A.....	30
Tableau 4 : Facteurs anti-angiogéniques connus	52
Tableau 5 : Biomarqueurs des anti-angiogéniques : cahier des charges	132
Tableau 6 : Molécules anti-angiogènes validées par la FDA.....	138
Tableau 7 : Essais cliniques en cours des inhibiteurs de l'angiogenèse	142

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules de l'organisme. Ces cellules échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. La carcinogenèse est un processus multi-étapes : lors de la phase initiale, dite phase dormante, il existe un équilibre entre les phénomènes de prolifération et ceux d'apoptose ; la tumeur est avasculaire, et sa taille reste inférieure à 2 mm. Le processus tumoral ne dépassera pas cette phase initiale dans la plupart des cas, et seule une faible proportion de tumeurs dormantes entrera en phase de croissance.

Ainsi, pour croître et subvenir à ses besoins nutritifs, la tumeur aura besoin de développer sa propre vascularisation. Le mécanisme prépondérant auquel elle aura recours est l'angiogenèse, qui consiste en la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'autres, préexistants.

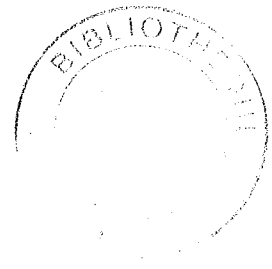
Priver la croissance tumorale des ressources qui lui sont nécessaires en bloquant la formation des néovaisseaux est un concept très prometteur qui a déjà commencé à faire ses preuves, et dont nous allons envisager les différents aspects.

Dans une première partie, nous envisagerons la physiopathologie de l'angiogenèse, ainsi que l'intérêt grandissant de cette dernière dans le traitement du cancer.

Dans une deuxième partie, nous étudierons les clés de l'angiogenèse tumorale, avec successivement son déroulement, ses différents acteurs et leur régulation, puis les différentes voies de signalisation intracellulaires qui entrent en jeu.

Pour finir, nous verrons différentes stratégies anti-angiogéniques, avec des molécules en cours d'essais thérapeutiques, ou déjà commercialisées.

1^{ère} partie : L'angiogenèse



Définitions : vasculogenèse, angiogenèse, artériogenèse

La création de néovaisseaux sanguins a pour but d'apporter aux tissus et aux cellules l'oxygène et les nutriments nécessaires à leur fonctionnement. Plusieurs mécanismes peuvent concourir à la formation de ces nouveaux vaisseaux : la vasculogenèse, l'angiogenèse, ainsi que l'artériogenèse (Carmeliet, 2005).

Au cours de l'embryogenèse, de nouveaux vaisseaux prennent naissance initialement comme de simples tubes de cellules endothéliales. Certains deviennent ensuite des capillaires après différenciation et apposition de péricytes ; d'autres se transforment en vaisseaux de plus gros calibre (artères, veines), après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de manière concentrique ou longitudinale. La formation du système vasculaire débute par la *vasculogenèse*, processus qui donne naissance à un réseau primitif de structures vasculaires, par différenciation de cellules endothéliales in situ, à partir de précurseurs mésenchymateux, les angioblastes (Pepper, 2000). La vascularisation de certains organes, comme les poumons, est également effectuée par *vasculogenèse*, tandis que d'autres, comme le système nerveux central, sont vascularisés par un processus d'*angiogenèse*, c'est-à-dire, la formation de nouveaux vaisseaux, par bourgeonnement à partir d'autres, préexistants. Le processus de néovascularisation dépend ainsi de l'origine de l'organe. La vasculogenèse est un mécanisme prépondérant dans les ébauches d'organes constitués de mésoderme et d'endoderme (poumon, pancréas, rate). En revanche, dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme (cerveau, rein), elle s'effectue par angiogenèse (Ortega *et al.*, 1997).

Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par *angiogenèse*. Cependant plusieurs preuves tendent à montrer un rôle de la *vasculogenèse* chez l'adulte. En effet, les précurseurs endothéliaux n'existent pas uniquement au cours de la vie embryonnaire : ils ont été identifiés dans le sang périphérique et dans la moëlle osseuse (Ferrara & Kerbel, 2005).

Trois mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse ont été identifiés (figure 1) : le « sprouting », l'intussusception, et la septation (Carmeliet, 2000) :

- Au cours du « sprouting », des cellules endothéliales sont activées, ce qui conduit à la dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire (MEC) environnante. La migration orientée des cellules endothéliales est suivie d'une phase de prolifération, puis d'une différenciation en structure capillaire. C'est le mécanisme le plus étudié de l'angiogenèse.
- L'angiogenèse intussusceptive est caractérisée par un élargissement et une séparation de vaisseaux déjà formés.
- Au cours de la septation, les cellules endothéliales poussent à l'intérieur des vaisseaux, pour créer des canaux vasculaires séparés.

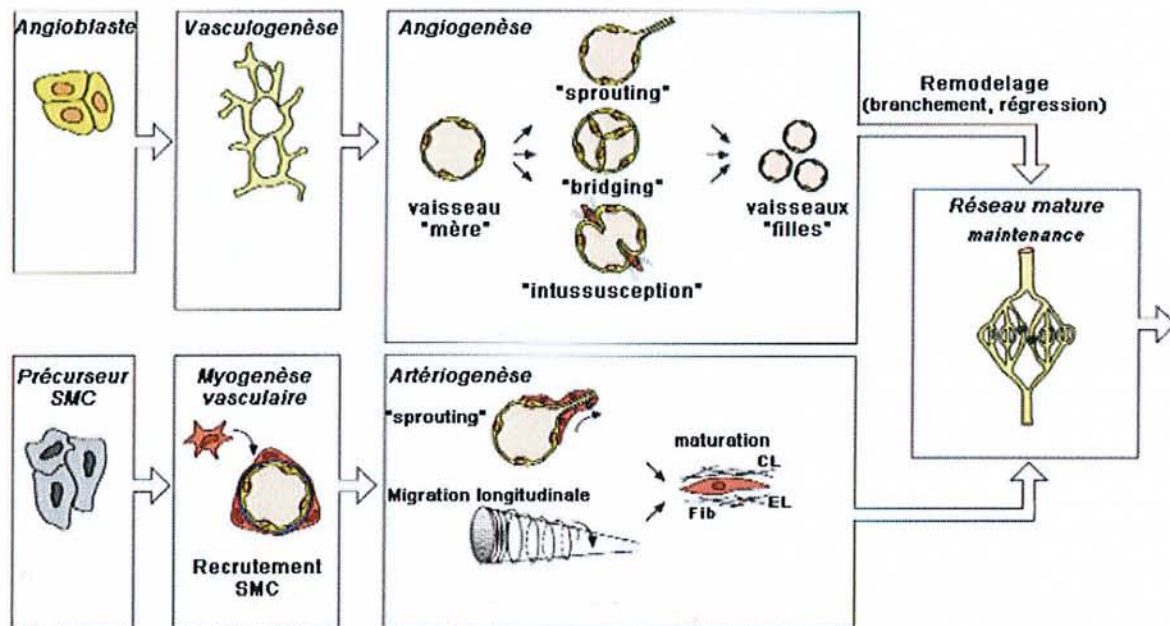


Figure 1 : Vasculogenèse et angiogenèse

Dans l'embryon, les cellules précurseurs endothéliales (angioblastes) s'assemblent en un réseau primitif (vasculogenèse), qui se développe et se remodèle (angiogenèse). Les cellules musculaires lisses (SMC) couvrent les cellules endothéliales pendant la myogenèse vasculaire et stabilisent les vaisseaux durant l'artériogenèse. CL, collagène ; EL, élastine ; Fib, fibrilline.

(D'après Carmeliet, 2000)

Pour finir, on peut également citer l'artériogenèse comme mécanisme de formation de nouveaux vaisseaux : c'est un processus de remodelage des petites artérioles préexistantes, conduisant à la formation d'un nouveau conduit artériel de plus grand diamètre. Ce phénomène est stimulé, en condition normoxique, par le stress de cisaillement relatif à

l'augmentation du flux sanguin (Schaper & Scholz, 2003). Ainsi, après l'occlusion d'une artère principale, l'artériogénèse peut conduire à l'élargissement de plus de 20 fois d'une artériole préexistante : c'est un mécanisme compensatoire efficace. Du point de vue du mécanisme : en réponse à l'augmentation du flux sanguin dans les artères collatérales, les cellules endothéliales vont exprimer des chimiokines ainsi que des molécules d'adhésion monocyttaire, favorisant l'infiltration de monocytes, qui vont alors détruire la média de l'artériole (production de protéases et libération de facteurs proapoptotiques). Les cellules endothéliales activées se multiplient et recrutent de nouvelles cellules musculaires lisses pour stabiliser le nouveau vaisseau. (Arras *et al.*, 1998)

1.1) Physiopathologie de l'angiogénèse

1.1.1) Angiogénèse physiologique

Chez un adulte, les vaisseaux sanguins sont formés par 1 à 6.10^{13} cellules endothéliales, ce qui représente environ 1 kg, et couvre une surface d'environ 1000 m². La plupart de ces cellules sont quiescentes. On estime chez l'adulte à 0,01%, la proportion de cellules endothéliales en activité de prolifération.

Les cellules endothéliales comptent parmi les plus stables de l'organisme, en effet, leur temps de renouvellement se porte à environ 1000 jours. Cependant, ce temps peut être ramené à 5 jours seulement, au cours de l'angiogénèse. (Folkman & Sching, 1992)

Ce n'est qu'au cours de processus physiologiques bien particuliers que l'angiogénèse est réactivée. Ainsi :

- lors du remodelage tissulaire cyclique dans le système génital féminin (dans l'ovaire : avant l'ovulation et pendant la formation du corps jaune ; dans le placenta et la glande mammaire : pendant la gestation)
- lors des phénomènes de réparation tissulaire. La fin du processus de cicatrisation s'accompagne de la régression de la majorité de ces néovaisseaux.
- Au cours de l'inflammation (aiguë et chronique). (Pepper *et al.*, 2000)

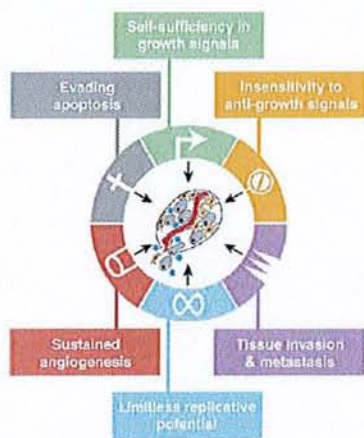
Dans les situations physiologiques, l'angiogénèse représente un phénomène transitoire, parfaitement régulé à l'aide de facteurs pro et anti-angiogéniques.

L'activation inappropriée de l'angiogénèse, par perte de ce processus de régulation, peut participer au développement de plusieurs pathologies.

1.1.2) Angiogenèse pathologique

1.1.2.1) Cancer

L'angiogénèse constitue une des six propriétés caractéristiques des cellules cancéreuses (figure 2).



- 1) Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération provenant de l'environnement.
- 2) Insensibilité aux signaux anti-prolifératifs.
- 3) Résistance à l'apoptose.
- 4) Prolifération illimitée (perte de la sénescence).
- 5) Capacité à induire l'angiogénèse.
- 6) Capacité d'invasion tissulaire et dissémination métastatique.

Figure 2 : Fiche signalétique de la cellule cancéreuse

(D'après Hanahan & Weinberg, 2000)

1.1.2.1.1) Angiogenèse et croissance tumorale

En 1971, Judah Folkman, qui a consacré toute sa carrière aux recherches sur l'angiogénèse, émet une hypothèse : sur la base d'un raisonnement simple - un tissu cancéreux est un tissu comme un autre qui a besoin de nutriments et d'oxygène véhiculés par les vaisseaux sanguins - il affirme que la croissance tumorale et le développement des métastases sont dépendants de l'angiogénèse. Les cellules cancéreuses ont en effet besoin de nutriments (O₂, glucose...) et de pouvoir éliminer leurs déchets (acidose, CO₂...). Tant que l'épaisseur de la tumeur est inférieure à quelques millimètres, la simple diffusion suffit généralement pour permettre ces échanges. Pour croître au-delà, les cellules du foyer tumoral vont envoyer des signaux de stimulation aux cellules endothéliales, normalement quiescentes. Ces cellules endothéliales vont alors acquérir un phénotype angiogénique. (Folkman, 1971)

L'importance de l'angiogenèse dans le cancer est notamment illustrée par les expériences de transplantations tumorales dans des organes avasculaires, comme par exemple la cornée du lapin, ou le vitré. (Gimbrone *et al.*, 1974).

L'oeil, grâce à son accessibilité, et aussi parce qu'il contient des tissus non vascularisés, a été depuis toujours un des modèles de prédilection pour analyser les mécanismes de l'angiogénèse et rechercher les moyens de s'y opposer.

En effet, lorsque les cellules tumorales sont inoculées dans un endroit avasculaire, elles prolifèrent jusqu'à une taille d'environ 1 mm³ puis stagnent et deviennent «dormantes». Lorsqu'on les inocule à nouveau dans des organes vasculaires, comme à proximité des vaisseaux de l'iris, elles prolifèrent donnant naissance à une tumeur massive et à des métastases. Ce «sommeil» tumoral correspond au stade où la tumeur n'est pas vascularisée. En l'absence d'angiogenèse, alors que le taux de prolifération des cellules tumorales reste élevé, il est contrebalancé par une activation de l'apoptose, dans une proportion équivalente. (Folkman, 1991)

Il ne faut cependant pas généraliser le caractère obligatoire de l'angiogenèse dans la progression du cancer : certaines tumeurs, comme les gliomatoses méningées, ou certaines leucémies, évoluent pratiquement sans angiogenèse.

1.1.2.1.2) Angiogenèse et dissémination métastatique

Une cellule tumorale, pour migrer à distance de son origine, à travers les vaisseaux, doit pouvoir les pénétrer. Dans les tumeurs expérimentales, on ne voit pas survenir de métastases avant la néo-vascularisation. On établit une corrélation entre le pouvoir métastatique des cellules tumorales et l'importance de la vascularisation de la tumeur primitive. Les cellules tumorales pénètrent à travers les capillaires de la néo-vascularisation qui seraient moins étanches que les capillaires normaux, elles peuvent donc les traverser facilement. (Weidner *et al.*, 1991)

Au niveau de la croissance capillaire, existent toutes les enzymes nécessaires à la migration des cellules endothéliales, et notamment ceux nécessaires à la dissolution de la membrane basale des vaisseaux, comme les collagénases de type IV ou V ou encore l'activateur du plasminogène. Mises à profit par les cellules tumorales, elles permettent à celles-ci de migrer.

Les clones métastatiques migrent à partir de la tumeur initiale. Au niveau du site métastatique, certaines sont capables de stimuler les cellules endothéliales de l'hôte, et ainsi de se développer. L'administration expérimentale à l'animal de substances inhibant cette angiogenèse va empêcher l'éclosion de métastases macroscopiquement visibles. Cependant, les cellules métastatiques sont présentes, mais « dormantes ». Elles ne s'exprimeront que lorsque le traitement à visée anti-angiogénique aura été arrêté. *In vivo*, chez l'homme, certains clones métastatiques ne possèdent probablement pas de pouvoir angiogénique et restent dormants pendant de nombreuses années (expliquant ainsi les métastases de survenue très tardives). ([http://1](#))

1.1.2.2) Autres pathologies

1.1.2.2.1) Rétinopathie diabétique

L'hyperglycémie chronique est à l'origine d'altérations dans la structure et la fonction des microvaisseaux et des macrovaisseaux. Les altérations de ces microvaisseaux sont en cause dans la rétinopathie diabétique, première cause de cécité chez l'adulte jeune en Occident.

Ces altérations vasculaires entraînent une ischémie tissulaire, qui va déclencher une série de processus visant à augmenter le flux sanguin dans le territoire lésé. Ces derniers permettent par l'ouverture de réseaux collatéraux de suppléance, et par le développement de nouveaux vaisseaux, de prévenir la mort tissulaire.

Ces mécanismes sont excessifs au niveau de la rétine, et sont ainsi responsables de la forme la plus sévère de rétinopathie. (Larger, 2003)

1.1.2.2.2) Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La DMLA est une cause majeure de la perte indolore de la vision centrale, et la cause principale de cécité chez les personnes de plus de 50 ans. La DMLA apparaît sous deux formes : exsudative ou atrophique.

La forme exsudative est provoquée par la croissance anormale de vaisseaux sanguins ; elle est également connue sous le nom de néovascularisation choroïdienne, ou angiogenèse oculaire sous la macula. De ces vaisseaux s'échappent des fluides et du sang qui génèrent des tissus cicatriciels détruisant la macula. Ceci se traduit par une détérioration de la vue allant de quelques mois à plusieurs années. ([http://2](#))

1.1.2.2.3) Polyarthrite rhumatoïde

Dans la polyarthrite rhumatoïde, il y a prolifération vasculaire au sein du pannus, ce qui permet son développement et sa croissance, favorisant secondairement la destruction cartilagineuse et osseuse, ainsi que le remodelage articulaire.

L'angiogenèse est ainsi un processus clé dans la maladie, faisant intervenir différents agents, tels que le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), principal médiateur pro-angiogénique présent dans le liquide synovial et dans le sérum de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, et dont l'expression est corrélée à la sévérité de la maladie. De même, l'angiopoïétine 1 (Ang1) est détectable au sein du tissu synovial. Les intégrines, le *fibroblast growth factor* (FGF) participent également à l'angiogenèse articulaire et donc au développement de la synovite rhumatoïde. (Clavel *et al.*, 2003)

1.1.2.2.4) Athérosclérose

Au niveau du développement d'une plaque d'athérome, l'évènement initiateur est la pénétration de *low density lipoprotein* (LDL) oxydés dans l'intima de la paroi vasculaire, qui sont reconnus par les récepteurs «éboueurs» («*scavenger receptors*») des macrophages. Il y a alors formation de cellules spumeuses. (Vainio & Ikonen, 2003)

L'expansion et la fragilisation de la plaque sont attribuées à un remodelage de la MEC par protéolyse, accompagnée d'une néovascularisation sur les sites d'inflammation. De plus, le recrutement et le transport d'un infiltrat riche en macrophages à l'intérieur de la paroi vasculaire entretiennent d'une part le développement de la plaque d'athérome par accumulation des macrophages, et d'autre part, le processus angiogénique car les macrophages stimulés par les LDL oxydés produisent du VEGF en grande quantité. (Ramos *et al.*, 1998)

En pathologie vasculaire, le rôle de l'angiogenèse dans la fragilisation des plaques d'athérome semble être un des mécanismes majeurs préliminaire à la rupture de la plaque qui conduit à la thrombose et à la survenue de l'accident vasculaire ischémique aigu.

1.2) L'angiogenèse tumorale : un enjeu thérapeutique dans le traitement du cancer

1.2.1) Structure des vaisseaux issus de l'angiogenèse tumorale vs vaisseaux normaux

Comme le montre le tableau 1, les néovaisseaux issus de l'angiogenèse tumorale sont très différents des vaisseaux sanguins normaux :

Tableau 1: Différences fondamentales entre les vascularisations normales et tumorales

	Vascularisation normale	Vascularisation tumorale
Organisation générale	Hiérarchisée	Anormale, chaotique
Péricytes	Présents	Absents ou détachés
Membrane basale	Présente et continue	Absente ou trop épaisse, discontinue
Diamètre des vaisseaux	Régulier	Irrégulier, vaisseaux dilatés
Densité des vaisseaux	Répartition homogène	Répartition hétérogène
Perméabilité aux molécules de poids moléculaire important	Faible	Importante
Statut par rapport à l'O ₂	Normoxique	Hypoxique
Perméabilité aux médicaments	Homogène	Hétérogène

(D'après Jain, 2005)

1.2.1.1) Sur le plan structurel

Ils forment un réseau anarchique, désorganisé, composé de vaisseaux immatures (figures 3 et 4). Ces vaisseaux sont dilatés, et présentent un diamètre irrégulier avec de nombreux embranchements, d'où un flux sanguin inadapté, et conduisant à des régions hypoxiques. Il n'y a pas de sphincter pré-capillaire. Ces vaisseaux sont fragiles : les cellules endothéliales forment des jonctions de type fenestrées, avec de larges espaces intercellulaires, une lame basale discontinue ou absente, et peu de péricytes (ces derniers jouent un rôle important dans les flux circulatoires). De plus, certaines cellules endothéliales anormales se chevauchent les unes les autres, et occupent une partie du lumen. (Dvorak, 2002)

Par conséquent, les débits en jeu sont très irréguliers, et la perméabilité considérablement augmentée. Ce type de vascularisation très perméable favorise le phénomène d'extravasation plasmatique. (Dvorak *et al.*, 1988)

Les dépôts de fibrine et fibronectine dans le stroma tumoral ainsi que l'apport de facteurs de croissance qui en résultent servent alors de matrice à la prolifération cellulaire.

L'hyperpression régnant dans le milieu interstitiel bloque la diffusion vers la tumeur des défenses naturelles de l'organisme, et des traitements. La perméabilité vasculaire favorise également le passage de cellules tumorales dans le flux sanguin, et donc l'apparition de foyers métastatiques secondaires (Folkman, 1975).

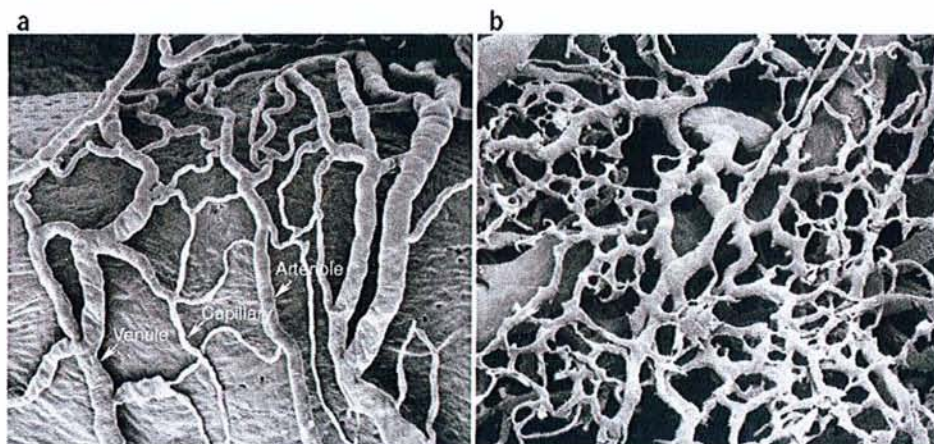


Figure 3 : Analyse microscopique des différences structurelles entre vaisseaux sanguins normaux et angiogéniques

a : Microscopie à balayage : vascularisation normale, avec un arrangement simple et organisé d'artérioles, capillaires et veinules.

b : Microscopie à balayage : néovascularisation tumorale, avec une désorganisation des vaisseaux sanguins et une perte de la hiérarchisation de ces vaisseaux. Les artérioles, capillaires et veinules ne sont plus différenciables.

(D'après Mac Donald & Choyke, 2002)

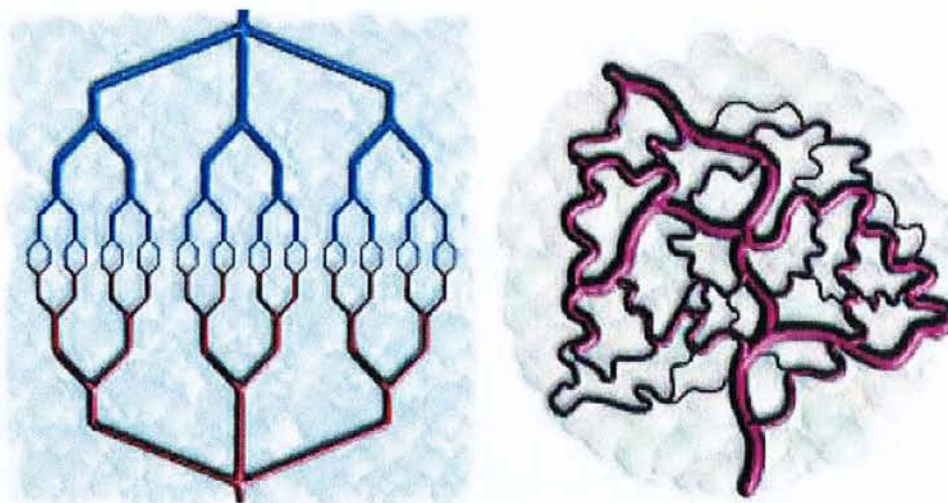


Figure 4 : Représentation schématique de l'architecture du réseau vasculaire normal, bien organisé ; et du réseau vasculaire tumoral, anormal et chaotique

(D'après Jain, 2002)

1.2.1.2) Sur le plan physiologique

Le stroma vasculaire des cancers n'est pas homogène. Il est commode de distinguer, au sein des cancers, la vascularisation :

- De la zone périphérique d'invasion tumorale,
- Du centre de la tumeur,
- De ses métastases.

1.2.1.2.1) Périphérie

Dans la zone périphérique d'invasion tumorale, la prolifération des cellules endothéliales est active et elle produit de nouveaux vaisseaux.

- **La prolifération vasculaire est particulièrement vigoureuse** et l'index de prolifération des cellules endothéliales est 50 à 200 fois plus élevé que pour les mêmes cellules des tissus normaux.
- **Les vaisseaux créés au sein de la tumeur sont anormaux.**
- **Ces vaisseaux défectueux ne sont pas contrôlables par les mécanismes locaux habituels**
- **L'efficacité de perfusion est médiocre.** Les courts-circuits artério-veineux s'opposent à une perfusion capillaire efficace. Le régime liquidien est chaotique avec des inversions de flux et une stase selon une période de 2 à 3 minutes.
- **Le drainage des fluides interstitiels est déficient**, en liaison avec l'excès de perméabilité et l'absence de drainage lymphatique fonctionnel.
- Enfin, cette **vascularisation est très inégalement répartie** en densité d'un point à un autre de la tumeur.

Dans cette région de la tumeur on retrouve des taux élevés de VEGF, de FGF, de thymidine phosphorylase (TP) ; tous ces facteurs sont induits par l'hypoxie.

(<http://3>)

1.2.1.2.2) Centre

Au centre de la tumeur se mêlent néovascularisation et vascularisation d'origine de l'hôte. La densité de microcirculation devient 4 à 10 fois plus faible que dans les berges. Les cellules tumorales s'adaptent à l'hypoxie en activant la glycolyse anaérobie. Les cellules endothéliales activent la fabrication des molécules du stress hypoxique (VEGF, TP, complexe VEGF/récepteur du VEGF) et les inhibiteurs de l'apoptose (bcl-2 : B-cell

leukemia/lymphoma 2). Cette stimulation augmente la fuite des cellules tumorales vers le système lymphatique (hyperpression), mais également vers la circulation sanguine.

(http://3)

1.2.1.2.3) Métastases

Les cellules malignes qui migrent à distance de la tumeur principale sont capables de s'implanter dans le nouveau site tissulaire et de croître localement sans l'aide d'une angiogenèse.

Expérimentalement des métastases peuvent s'implanter dans la substance cérébrale sans angiogenèse. Néanmoins, sans angiogenèse, les nodules métastatiques restent sensibles à l'apoptose. Le développement local d'une angiogenèse protège les cellules tumorales de l'apoptose. C'est un des mécanismes invoqués pour expliquer l'efficacité expérimentale des agents anti-angiogéniques sur la croissance des nodules métastatiques.

(http://3)

Au total on retiendra que la néovascularisation issue de l'angiogenèse tumorale présente un état d'activation cellulaire maximum pour une efficacité de perfusion médiocre, qu'elle est très hétérogène en terme de densité, de maturation phénotypique d'une zone tumorale à l'autre, d'une tumeur à l'autre au sein du même type. On notera que l'activation cellulaire endothéliale peut protéger indirectement les cellules tumorales en inhibant l'apoptose.

1.2.2) Avantages des cellules endothéliales comme cibles anti-cancéreuse

Concentrer le traitement sur la cellule endothéliale et ses facteurs de croissance possède de nombreux avantages par rapport à un traitement dirigé contre la cellule tumorale.

1.2.2.1) Accessibilité

Un agent toxique pour les cellules endothéliales arrive facilement à sa cible, par administration systémique. En revanche, un agent dirigé contre une tumeur doit d'abord diffuser de longues distances et vaincre la pression interstitielle élevée typique des tumeurs solides. (Ferrara & Alitalo, 1999)

De plus, comme vu précédemment, la perfusion au centre de la tumeur est assez précaire.

1.2.2.2) Stabilité génétique

L'un des principaux facteurs d'échec des thérapies anti-cancéreuses classiques, est l'acquisition de résistances au traitement par les cellules tumorales. Dans les cellules tumorales, les mutations sont nombreuses et leur réplication est intense. La pression de sélection induite par les traitements cytotoxiques finit par sélectionner des cellules tumorales résistantes au traitement et très agressives. La thérapie anti-angiogénique cible les cellules endothéliales. A la différence des cellules tumorales, les cellules endothéliales sont stables génétiquement, les mutations spontanées sont rares. Il se développe donc moins souvent de résistances qu'avec les drogues ciblant directement les cellules tumorales. Des traitements prolongés peuvent ainsi être envisageables. (Boehm *et al.*, 1997)

L'acquisition de résistances pour les cellules endothéliales est un évènement de faible fréquence, mais existant. Des travaux précliniques, et certaines données cliniques, suggèrent la possibilité d'émergence de résistances aux anti-angiogéniques, selon trois mécanismes principaux :

- 1) la sélection de mutants cellulaires tumoraux résistant à l'hypoxie, moins dépendants de l'angiogenèse tumorale ;
- 2) l'enrichissement tumoral progressif, à mesure que les néovaisseaux immatures dépérissent sous l'effet du traitement, en vaisseaux matures couverts de péricytes, moins sensibles aux anti-angiogéniques ;
- 3) la redondance, notamment aux stades avancés des cancers, des facteurs de croissance pro-angiogéniques.

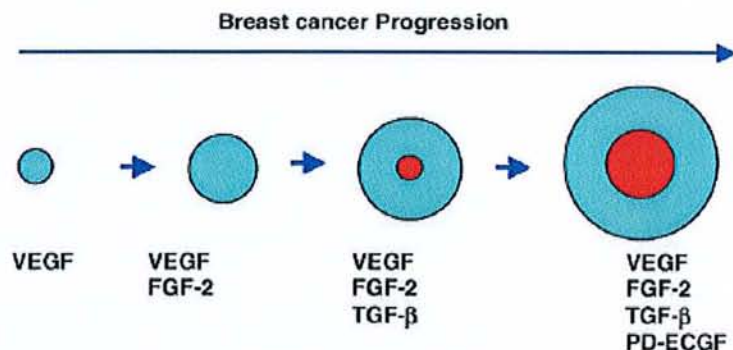


Figure 5 : Evolution de l'expression des facteurs angiogéniques au cours de la progression du cancer du sein
Une tumeur récente du sein exprimera uniquement VEGF comme stimulus angiogénique. Au fur et à mesure de la progression tumorale, d'autres facteurs tels que FGF-2, TGFβ (*transforming growth factor β*) ou PD-ECGF (*platelet-derived endothelial cell growth factor*), seront également exprimés.

(●) Tissu tumoral (●) Centre nécrotique

(D'après Cao, 2004)

En effet, outre le VEGF, médiateur-clé de l'angiogenèse tumorale, on peut trouver, au sein des compartiments cellulaires tumoraux et/ou endothéliaux, divers autres facteurs pro-angiogéniques : FGF, angiopoïétine 1 et 2, IL-6 (interleukine 6), IL-8, *placenta growth factor* (PLGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF), etc...(figure 5)

Hanahan (2005) et son équipe ont utilisé des souris *RIP-Tag2*, qui développent spontanément des tumeurs des îlots pancréatiques, croisées avec des souris génétiquement déficientes pour le gène *Rag1*, incapables de toute réponse immunitaire.

Ils ont pu ainsi étudier, dans ce modèle *RIP-Tag2 Rag1 -/-*, l'effet d'anticorps antiangiogéniques, sans «bruit de fond» dû à une réponse immunitaire murine. L'administration intrapéritonéale d'anticorps anti-VEGFR-2 (*anti-vascular endothelial growth factor receptor 2*), qui est un récepteur clé de l'angiogenèse, au stade précoce de la carcinogenèse (avant la cinquième semaine) a totalement prévenu le développement de lésions précancéreuses, dites «îlots rouges», parce qu'hypervasculaires et microhémorragiques. En revanche, les anticorps anti VEGFR-1 étaient inefficaces.

A un stade plus tardif (10-13 semaines), où les tumeurs sont constituées, l'anti-VEGFR-2 (mais non l'anti-VEGFR-1) diminuait le volume tumoral, la densité et la perméabilité vasculaire tumorale. Les tumeurs des animaux traités étaient moins bien encapsulées, et d'aspect histologique plus «agressif». Le traitement pendant 10 jours de ces tumeurs établies montrait un effet cytostatique tumoral de l'anti-VEGFR-2 ; cependant, la prolongation du traitement pendant 4 semaines (impossible chez les souris témoins, qui mouraient plus tôt de leur progression tumorale) était associée à un échappement tumoral : augmentation de la masse tumorale à un niveau supérieur au niveau initial, réapparition de néovaisseaux, etc... Cet échappement n'était pas dû à une faillite du blocage VEGFR-2 : le récepteur restait indétectable. En fait l'hypoxie tumorale induite par l'anti-VEGFR-2 est associée à une production accrue d'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques qui viennent relayer le VEGF : FGF-1, FGF-2, FGF-7, éphrines A1 et A2, Ang1 et 2.

L'ajout d'un anti-FGF à l'anti-VEGFR-2 permet de contrer l'échappement tumoral, et d'obtenir à nouveau une régression tumorale et une diminution de la densité vasculaire tumorale.

Si ces résultats ne sont pas encore reproduits chez l'homme, et si leur portée est amoindrie par le fait que les anti-angiogéniques sont actuellement généralement associés à une chimiothérapie, ils militent tout de même en faveur d'un traitement anti-angiogénique personnalisé en fonction des facteurs pro-angiogéniques à l'œuvre à chacun des stades

tumoraux, voire en un traitement anti-angiogénique multicibles systématique, en cas de progression tumorale, ou même avant cette dernière. (Casanovas *et al.*, 2003)

1.2.2.3) Large panel de cancers concernés

Le principal avantage de la thérapie anti-angiogénique est qu'elle est applicable à une très grande diversité des génotypes et phénotypes tumoraux.

1.2.2.4) Marqueurs spécifiques

Les cellules endothéliales des tumeurs se divisent 50 à 100 fois plus rapidement que les cellules endothéliales normales, et ces cellules activées expriment des marqueurs qui ne sont pas présents ou moins nombreux, sur les cellules endothéliales quiescentes.

1.2.2.5) Moins d'effets secondaires

Comme vu précédemment, l'angiogénèse chez l'adulte est assez limitée, d'où peu d'effets secondaires sur l'angiogénèse physiologique, à la différence de ceux observés avec les chimiothérapies anticancéreuses, ce qui en limite ainsi les doses administrables. (Manley *et al.*, 2004)

1.2.2.6) Possibilité d'associations avec des thérapeutiques existantes

De nombreuses associations peuvent être envisagées : plusieurs anti-angiogéniques entre eux, des anti-angiogéniques accompagnés de chimiothérapie, des anti-angiogéniques et de la radiothérapie...

1.2.2.7) Autres

De nombreuses cellules tumorales ne sont dépendantes que d'un seul micro-vaisseau, ainsi, la destruction d'un petit nombre de ces micro-vaisseaux peut avoir un effet anti-tumoral conséquent. De plus l'inhibition de l'angiogénèse ne demande pas une destruction totale des vaisseaux. En effet, la discontinuité de l'endothélium provoque la formation d'un thrombus occlusif, bloquant l'afflux de sang vers la tumeur. (Ferrara & Alitalo, 1999)

Tous ces avantages illustrent ainsi l'intérêt grandissant du ciblage de l'angiogenèse en cancérologie, ciblage que nous allons mieux comprendre à travers la 2^{ème} partie, dans laquelle nous tenterons d'expliquer les mécanismes de l'angiogenèse.

2^{ème} partie : Mécanismes régissant l'angiogenèse

Les molécules et mécanismes mis en jeu au cours de l'angiogenèse tumorale sont très similaires à ceux impliqués dans l'angiogenèse embryonnaire. Néanmoins, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la nature des vaisseaux formés est distincte : le réseau vasculaire formé au cours de l'angiogenèse physiologique est organisé, composé de vaisseaux matures ; alors que le réseau tumoral est chaotique, hétérogène et désorganisé, constitué de vaisseaux immatures.

2.1) Déroulement de l'angiogenèse

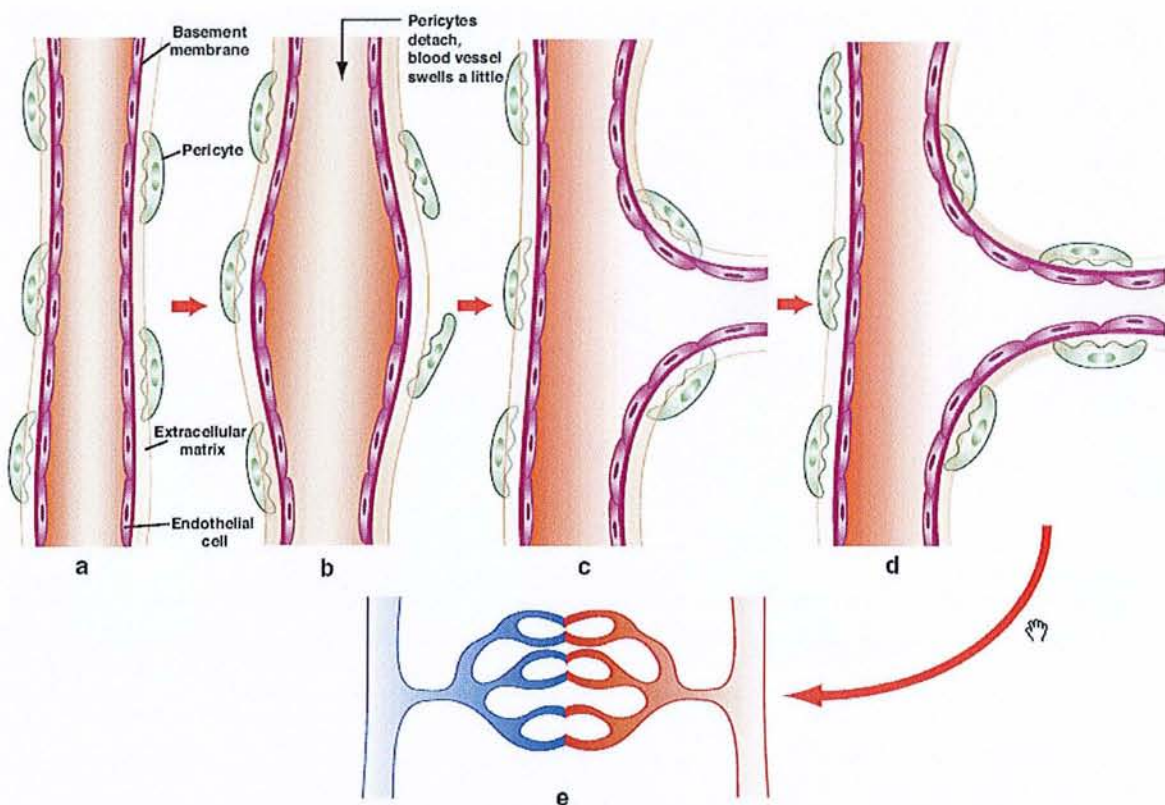


Figure 6 : Angiogenèse bourgeonnante : schéma simplifié de son déroulement

- Vaisseau sanguin normal.
- Des péricytes se détachent du vaisseau sanguin, aux endroits où la balance locale entre facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques est en faveur de l'angiogenèse. La membrane basale, ainsi que la MEC sont dégradées.
- Les cellules stromales synthétisent une nouvelle MEC, qui avec l'aide de facteurs de croissance solubles, va guider la migration et la prolifération de cellules endothéliales, pour former une structure tubulaire.
- Les péricytes ou les cellules musculaires lisses vont se placer à la surface de ce bourgeonnement et vont aider à le stabiliser.
- Le nouveau bourgeon fusionne avec d'autres, pour former une nouvelle circulation

(D'après Nicosia, 2005)

Nous distinguons ainsi 3 étapes que nous pouvons qualifier de « morphologiques » : (figure 6)

- La prolifération

Elle correspond à l'apparition de bourgeons de cellules endothéliales sur la surface externe des vaisseaux sanguins préexistants.

Les sites privilégiés de formation de ces bourgeons sont les capillaires et à un moindre degré les veinules. Les bourgeons endothéliaux néoformés font saillie à la surface externe des vaisseaux. Ils sont d'abord pleins puis se creusent rapidement de lumières se terminant en cul-de-sac. (Matto *et al.*, 1998)

- La migration

Elle correspond à la croissance des bourgeons formés à la surface des vaisseaux. Ils s'allongent rapidement et migrent de façon orientée et vectorielle. Lors de l'angiogenèse tumorale, les bourgeons migrent vers le foyer tumoral, source de stimulus angiogénique. (Vandenbunder *et al.*, 1994)

- L'organisation

Elle correspond à la reconstitution d'un réseau capillaire. Les capillaires néoformés s'anastomosent les uns aux autres et acquièrent leur architecture fonctionnelle. Comme nous l'avons vu précédemment, les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont différents des réseaux capillaires normaux. Les capillaires associés aux tumeurs sont ainsi en évolution constante. Ils accompagnent la croissance du foyer tumoral et suivent le développement de la stroma-réaction. En permanence, des capillaires disparaissent tandis que d'autres apparaissent de manière rapide. De nouveaux bourgeons capillaires formés lors de phases successives de stimulation angiogénique viennent fusionner avec les capillaires préexistants. Comme les cellules normales au cours de l'embryogenèse, les cellules cancéreuses (notamment celles d'origine épithéliale ou glandulaire) s'entourent de cellules de soutien (fibroblastes, cellules vasculaires) nécessaires à leur survie, qui constituent un complément non cancéreux à la tumeur, appelé stroma-réaction.

Cette réaction tissulaire peut parfois être, en volume, plus importante, que le contingent cancéreux lui-même. (Dvorak, 2002)

2.2) Acteurs et voies de signalisation mis en jeu et rôle au sein de l'angiogenèse tumorale

2.2.1) Acteurs de l'angiogenèse tumorale

On dénombre aujourd'hui une centaine de molécules intervenant dans l'angiogenèse (initiation, régulation...). Ces molécules peuvent être regroupées en 7 classes : (figure 7)

- Les facteurs de croissance et leurs récepteurs
- Les molécules de signalisation
- Les molécules d'adhésion
- Les protéines de la MEC
- Les protéinases
- Les molécules intervenant dans les phénomènes de maturation, de morphogenèse et de guidance
- Les facteurs de transcription

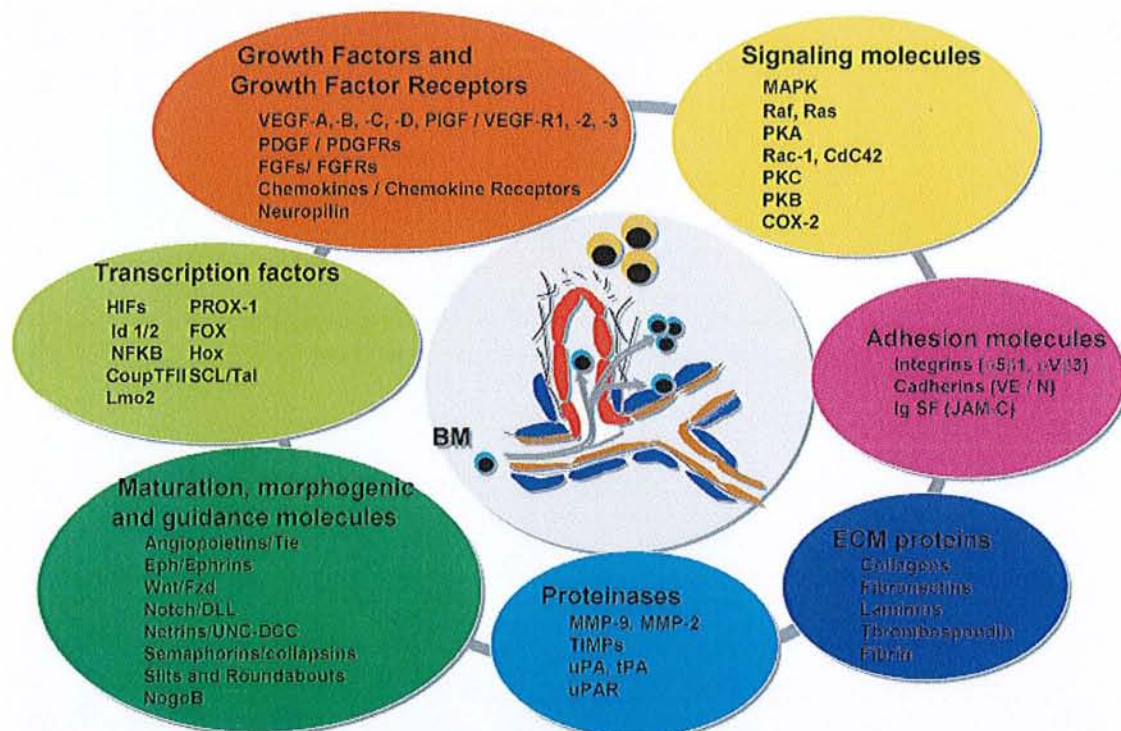


Figure 7 : Les différentes classes de molécules intervenant au cours de l'angiogenèse

(D'après <http://4>)

Certains de ces acteurs présentent une importance fondamentale dans le processus angiogénique ; leurs rôles respectifs sont illustrés dans la figure 8.

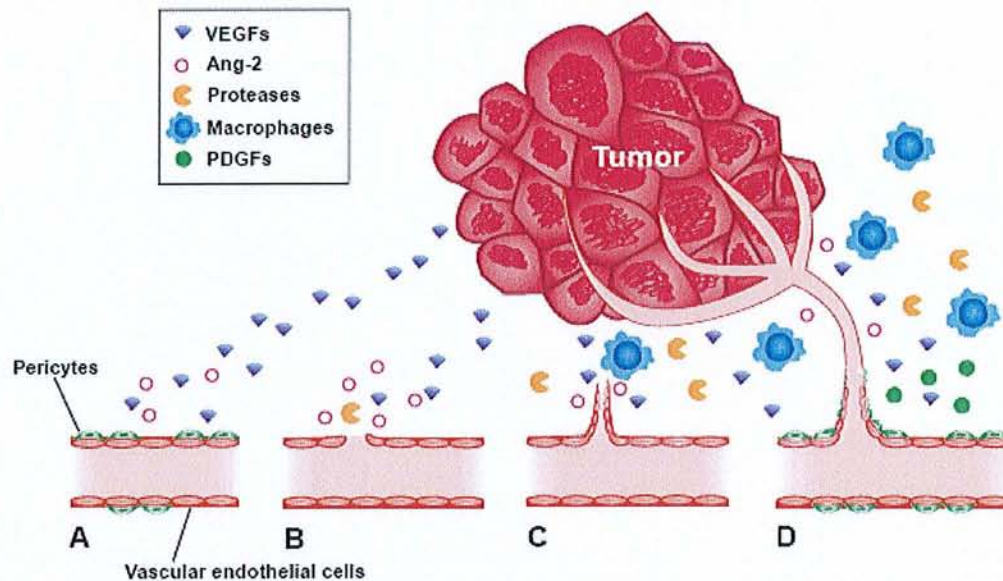


Figure 8 : Schéma simplifié du rôle des principaux acteurs mis en jeu dans l'angiogenèse

- L'hypoxie, ou d'autres stimuli, entraînent la libération par la tumeur, de facteurs pro-angiogéniques (tels que le VEGF), qui vont stimuler directement ou indirectement la prolifération et la migration de cellules endothéliales.
- La sécrétion d'enzymes protéolytiques (protéases) entraîne une dégradation de la membrane basale du vaisseau sanguin précurseur, et la faiblesse des interactions cellulaires ; ce qui est nécessaire pour la génération de nouveaux vaisseaux sanguins.
- Des cordons de nouvelles cellules endothéliales s'organisent en tubes creux, créant ainsi de nouveaux vaisseaux sanguins. Des macrophages (et d'autres cellules myéloïdes) sont attirés vers le site et sécrètent d'autres protéases et facteurs qui encouragent la formation de nouveaux vaisseaux.
- Le VEGF-A, ou d'autres facteurs de croissance, stimulent la croissance de cellules endothéliales, leur division, et leur production de facteurs de croissance de l'angiogenèse. (ex : PDGF)

(D'après Nicosia, 2005)

2.2.1.1) Acteurs de la dégradation de la MEC

La protéolyse extracellulaire est nécessaire pour l'angiogenèse, car elle permet la dégradation de la lame basale sous-endothéliale, l'invasion de la MEC et la formation d'une lumière au sein d'un capillaire néoformé. Elle est également impliquée dans la régulation de l'activité de certaines cytokines, soit en activant des formes latentes (par exemple TGF β), soit en permettant le relargage des cytokines liées à la MEC (par exemple le FGF basique). Une autre conséquence de cette protéolyse est la formation de fragments protéiques ayant eux-mêmes une activité biologique (par exemple l'endostatine, formée à partir du collagène XVIII). (Pepper, 2000)

La dégradation de la MEC au cours de l'angiogenèse implique deux grands systèmes protéasiques :

- le système du récepteur de l'urokinase/urokinase (uPAR/uPA, *urokinase plasminogen activator receptor/urokinase plasminogen activator*)
- et le système des métalloprotéinases matricielles (MMP, *matrix metallo-proteinase*)

2.2.1.1.1) Le système uPAR/uPA

Le plasminogène est une molécule synthétisée par le foie. C'est une pro-enzyme présente dans les liquides corporels. Sa forme active, la plasmine, est impliquée principalement dans la fibrinolyse. Elle peut cependant dégrader d'autres composants de la matrice extracellulaire en activant certaines MMPs.

La transformation du plasminogène en plasmine se fait par l'intermédiaire des activateurs du plasminogène (PA, *plasminogen activator*). Ces derniers sont des sérine-protéases dont on connaît deux types : le type tissulaire (tPA, *tissue plasminogen activator*) et le type urokinase (uPA). (Nalbone *et al.*, 2001)

Le tPA est impliqué essentiellement dans la fibrinolyse intra-vasculaire (thrombolyse).

Par contre, **l'uPA** intervient surtout dans la dégradation de la MEC et dans la migration cellulaire. Elle est sécrétée par divers types cellulaires, dont les cellules cancéreuses et les celles du stroma tumoral. L'uPA est synthétisé et sécrété sous une forme inactive, monocaténaire : la pro-uPA. L'urokinase, molécule beaucoup plus active, est libérée par clivage peptidique. Elle est constituée de deux chaînes A et B, reliées par des ponts disulfures. La chaîne A comprend le fragment N-terminal appelé *amino-terminal fragment* (ATF). La chaîne B comporte le domaine enzymatique, situé dans sa partie C-terminale.

La fixation de la pro-uPA sur le récepteur de l'uPA facilite sa transformation en uPA et l'activation du plasminogène en plasmine à la surface des cellules. (Blasi & Carmeliet, 2002)

Des inhibiteurs spécifiques (PAI, *PA inhibitor*) et un récepteur cellulaire pour l'uPA (*uPA receptor*, uPAR) représentent des facteurs importants de la régulation de l'activité des activateurs du plasminogène.

uPAR est une protéine liée à la surface cellulaire par un domaine de glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Le groupement GPI assure une mobilité importante de l'uPAR dans la membrane, ce qui permet en particulier de le concentrer au niveau du front de migration cellulaire.

NB.: le clivage du GPI permet la formation d'une forme soluble de l'uPAR : le suPAR. Cette forme peut lier l'uPA. Elle a été retrouvée dans le plasma et d'autres fluides, particulièrement chez des patients présentant une inflammation, un cancer du poumon ou de l'ovaire. Le rôle physiologique de suPAR n'est pas encore élucidé. Cependant, il a été décrit une inhibition de la prolifération et de l'invasion de cellules tumorales *in vitro* par du suPAR recombinant, vraisemblablement par rétention de l'uPA. (Mohanam *et al.*, 1999)

Les fonctions du complexe uPAR/uPA

- activation du plasminogène :

La fixation de la pro-uPA sur l'uPAR facilite son activation en uPA. L'uPA, associée à son récepteur va hydrolyser le plasminogène, qui est lui-même ancré à la membrane. Le plasminogène, formé d'une chaîne unique, est ainsi clivé en deux chaînes reliées par un pont disulfure, formant la plasmine. Les récepteurs membranaires pour le plasminogène permettent de localiser l'activité de la plasmine à la surface cellulaire, au niveau du front de migration.

L'activité de l'uPA peut être bloquée de façon compétitive par l'ATF, dépourvue de centre actif, et donc d'activité enzymatique (mais renfermant néanmoins le site de liaison à l'uPAR). L'ATF ayant une demi-vie courte, son administration a été réalisée par thérapie génique, à l'aide d'adénovirus. Cette thérapie a donné des résultats satisfaisants dans la thérapie anticancéreuse dans plusieurs modèles murins. (Li *et al.*, 1998)

- adhésion des cellules, motricité cellulaire

L'uPAR, essentiellement localisé au niveau du front de migration cellulaire, module l'adhésion des cellules à la matrice. Ce mécanisme d'adhésion réversible est adapté à la migration des cellules, qui nécessite l'alternance de phases d'ancrage et de migration sur la MEC.

L'uPAR peut former un complexe stable avec certaines intégrines, et moduler ainsi secondairement les capacités de liaison des intégrines aux protéines de la matrice (Blasi & Carmeliet, 2002). L'association de l'uPA sur son récepteur module l'affinité de l'uPAR pour ces intégrines.

Les PAI

L'activité de l'uPA et du tPA est inhibée par deux principaux inhibiteurs physiologiques : le PAI-1 et le PAI-2.

Le PAI-1 est le principal inhibiteur de l'uPA et du tPA. Son expression est fortement stimulée par les cytokines, les facteurs de croissance ou l'endotoxine. Il a été montré que le bFGF et le VEGF, deux facteurs angiogéniques, sont capables de stimuler la synthèse de PAI-1 dans les cellules endothéliales.

2.2.1.1.2) Les MMPs (matrix metalloproteinases)

La protéolyse extracellulaire est également réalisée par les métalloprotéinases de la matrice (MMPs), qui représentent une famille d'enzymes capables de dégrader la plupart des composants de la matrice. Elles clivent diverses protéines de la MEC : structurales (collagène, laminine, fibronectine...) ou non (facteurs de croissance, récepteurs à la surface cellulaire...). Ces enzymes sont principalement sécrétées, mais il existe également des MMP transmembranaires appelées *membrane-type MMPs* ou MT-MMPs.

- Les MMPs sécrétées comprennent les collagénases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), les gélatinases (gélatinase A, MMP-2 ; gélatinase B, MMP-9), les stromélysines (stromélysine 1, MMP-3 ; stromélysine 2, MMP-10 ; stromélysine-3, MMP-11) et les autres MMPs (MMP-7 et MMP-12).
- Les MT-MMPs sont les MMP-14, 15, 16, 17, 21

Les MMPs sont solubles, à l'exception du groupe MT-MMPs, qui contient un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale et qui est localisé à la surface des cellules. (Pepper, 2001)

Les métalloprotéinases possèdent une structure similaire et leur activité est dépendante d'un atome de Zn. Les MMPs possèdent toutes un prédomaine correspondant au peptide signal de sécrétion et un prodomaine qui est enlevé lorsque l'enzyme est activée par clivage. Elles possèdent également un domaine catalytique contenant un ion Zn, et à côté, un domaine contenant un site de liaison pour les *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs).

La plupart des MMPs sont sécrétées sous la forme d'un zymogène latent qui est activé par protéolyse à l'extrémité carboxy-terminale, ce qui permet de libérer le pro-domaine et de dégager ainsi le site actif qui contient un ion Zn.

La plupart des MMPs sont activées par différentes protéases, dont la plasmine et, pour certaines, l'uPA, ainsi que par des ions mercuriques et certains dénaturants qui dissocient la liaison entre l'atome de zinc et le pro-domaine. Possédant une activité protéasique, les MMPs participent à leur propre activation. (Liekens *et al.*, 2001, Silvestre *et al.*, 2002)

MMPs et angiogenèse

Le premier obstacle que rencontre la cellule endothéliale est formé par la membrane basale constituée de collagène IV, de laminine, de fibronectine et d'autres composants matriciels.

- La MMP-2, aussi appelée collagénase de type IV, participe à la dégradation de la membrane basale. Une fois cette barrière vasculaire franchie, les cellules endothéliales doivent se frayer un chemin à travers des fibrilles de collagène, d'élastine, de protéines microfibrillaires et de protéoglycanes.
- La MMP-9 (ou gélatinase B) lyse les fibres d'élastine et les noyaux protéiques des protéoglycanes.

Des preuves de l'implication des gélatinases dans l'angiogenèse ont été apportées par des études génétiques effectuées chez la souris :

- Les souris déficientes en MMP-2 et MMP-9 sont viables mais présentent clairement un phénotype moins angiogénique. L'angiogenèse tumorale est réduite chez les souris dont le gène codant pour MMP-2 a été invalidé. Chez les souris déficientes en MMP-9, l'angiogenèse du tissu osseux est altérée sans doute en raison d'une diminution de la libération de facteurs pro-angiogéniques par le cartilage hypertrophique. (Itoh *et al.*, 1998)
- Dans un modèle de carcinogenèse de cellules bêta-pancréatiques chez les souris transgéniques Rip1Tag2, l'angiogenèse tumorale est dépendante du VEGF, cependant, chez ces souris, il n'y a pas d'augmentation du niveau d'expression du VEGF ou de

ses récepteurs tyrosine kinase. Le VEGF est en fait mobilisé à partir des stocks matriciels, favorisant ainsi l'activation des récepteurs du VEGF. Cette mobilisation est dépendante de l'activité MMP-9 qui est augmentée pendant la progression tumorale et plus spécifiquement pendant la transition de la phase pré-vasculaire vers la phase vasculaire. (Gabison *et al.*, 2003) La progression tumorale est inhibée chez la souris transgénique Rip1Tag2 dont le gène MMP-9 a été invalidé. Bien que les activités MMP-2 et MMP-9 augmentent en parallèle chez les souris Rip1Tag2, les souris Rip1Tag2 dont le gène MMP-2 a été invalidé ne présentent pas de changement dans la progression tumorale. L'activation et la présence d'une matrice extracellulaire dégradable sont donc indispensables à l'effet pro-angiogénique des facteurs de croissance. (Bergers *et al.*, 1999)

- La MMP-2, aussi appelée collagénase de type IV, ainsi que la MMP-9 (ou gélatinase B), sont critiques pour le « switch » angiogénique, que nous détaillerons dans un chapitre suivant (Rundhaug, 2005).

D'autres MMPs jouent un rôle important dans l'angiogénèse, telle que la MT1-MMP :

- Il a été montré que la MT1-MMP joue un rôle dans l'angiogénèse physiologique et tumorale. Des expériences d'inactivation de gène chez l'animal, ont montré que cette MT-MMP est une protéase majeure dans le processus d'angiogénèse (Holmbeck *et al.*, 1999). La MT1-MMP participe au remodelage de la matrice extracellulaire de façon directe en dégradant certains de ses composants et de façon indirecte en activant la pro-MMP-2 (Sounni *et al.*, 2003).

Les MMPs sont ainsi cruciales pour l'angiogénèse. Elles dégradent la matrice extracellulaire en faisant de la place pour les cellules endothéliales en migration. Elles contribuent aussi à l'angiogénèse en détachant les péricytes des vaisseaux angiogènes et en libérant des facteurs de croissance liés à la matrice extracellulaire. De plus, elles génèrent des fragments promigratoires de la matrice extracellulaire et clivent la *vascular endothelial cadherin* (VE-cadhérine) afin de briser les adhésions cellule-cellule.

NB.: Les MMPs peuvent aussi contribuer négativement au processus d'angiogénèse en générant des inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse par clivage protéolytique de certaines chaînes de collagène et du plasminogène. Ainsi, MMP-2, MMP-7, MMP-9 et MMP-12

peuvent hydrolyser le plasminogène pour former l'angiostatine, un puissant inhibiteur de l'angiogenèse. De même, un autre facteur antiangiogène, l'endostatine peut être libéré par MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 et MMP-20 (Rundhaug, 2005).

Inhibition de l'activité MMP

L'inhibition de l'activité MMP est suffisante pour bloquer l'effet pro-angiogénique du bFGF dans la cornée de rat. (Johnson *et al.*, 1994)

Le BB-94, un inhibiteur des MMPs, et TIMP-2 bloquent la néovascularisation induite par des facteurs de croissance dans un gel de fibrine.

Le domaine C-terminal de MMP-2 (le fragment hémopexine : PEX) inhibe également l'angiogenèse induite par le bFGF dans le modèle de la membrane chorio-allantoïde de poulet. PEX prévient l'activité collagénolytique à la surface cellulaire en bloquant l'activation et l'activité de MMP-2. PEX bloque également la fixation de MMP-2 sur l'intégrine $\alpha\beta3$, et ainsi la réponse angiogénique. (Brooks *et al.*, 1998)

Régulation de l'activité des MMPs

L'existence d'inhibiteurs spécifiques (les TIMPs), de même que la sécrétion sous forme latente des MMPs, constituent des éléments cruciaux de la régulation de l'activité des MMPs. L'activité des MMPs est notamment contrôlée par quatre inhibiteurs tissulaires dans un rapport stoechiométrique 1:1. Les TIMP1 et 2 inhibent toutes les MMPs, le TIMP1 ayant une plus forte affinité pour les MMP-1, 2, 3 et 9.

Les TIMPs sont des protéines ou des glycoprotéines qui diffèrent par leurs propriétés comme leur schéma d'expression (inductible, constitutif), leur solubilité... Ils se lient aux MMPs et peuvent aussi lier de façon spécifique des pro-MMPs, régulant alors leur activation.

2.2.1.1.3) Relations entre les deux systèmes protéasiques uPAR/uPA et MMPs

Les relations qui existent entre les deux systèmes protéasiques uPAR/uPA et MMPs sont illustrées par la figure 9.

L'uPA fixée à son récepteur (uPAR) catalyse la transformation du plasminogène en plasmine. La plasmine participe à la dégradation de la fibrine et de certaines protéines matricielles, mais

aussi à l'activation de la majorité des pro-MMPs. Le rôle régulateur de ces processus est assuré, d'une part, par le PAI-1 qui inhibe l'activation du plasminogène en plasmine et, d'autre part, par les TIMPs qui inhibent l'activation des pro-MMPs. Par ailleurs, ce schéma montre aussi le rôle potentiel du système fibrinolytique dans l'adhérence cellulaire. L'uPAR fonctionnellement associé à l'intégrine $\alpha V\beta 3$, lie la vitronectine et joue ainsi une fonction adhésive. Le PAI-1, en liant le même domaine que l'uPAR sur la vitronectine, entre ainsi en compétition avec l'uPAR et déplace la liaison établie par ce dernier.

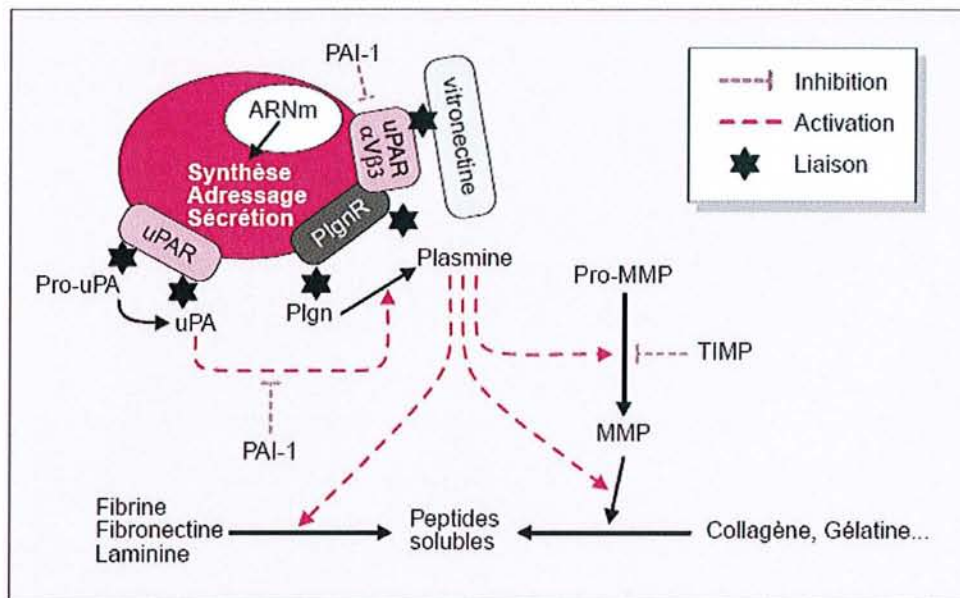


Figure 9 : Liens unissant les deux systèmes protéolytiques uPAR/uPA et MMPs
Plgn : plasminogène ; PlgnR : récepteur du plasminogène

(D'après Nalbone *et al.*, 2001)

2.2.1.2) Acteurs pro-angiogènes

Les facteurs de croissance polypeptidiques, ou cytokines, modulant le comportement des cellules endothéliales (prolifération, différenciation, migration), de façon positive ou négative, sont produites par des cellules épithéliales ou conjonctives normales, ou par des cellules tumorales. Ces cytokines peuvent être stockées dans la matrice extracellulaire.

Le tableau 2 nous présente la grande diversité qui existe au niveau des cytokines impliquées dans la régulation positive de l'angiogenèse. Nous verrons par la suite que la puissance et l'intérêt de certains de ces acteurs priment sur ceux des autres. Les mieux étudiés appartiennent aux familles du VEGF et du FGF.

Tableau 2 : Facteurs pro-angiogéniques connus

FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES
Angiogénine
Ang1
Del-1 (Developmental endothelial locus 1)
FGFa et FGFb
Follistatine
G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)
HGF/SF (hepatocyte growth factor/scatter factor)
IL-8
Leptine
Midkine
PIGF
PD-ECGF
PDGF
Pleiotropine
Proliférine
TGF- α
TGF- β
TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)
VEGF-VPF

(D'après <http://5>)

2.2.1.2.1) Le système du VEGF

2.2.1.2.1.1) Les membres de la famille du VEGF

C'est une famille de facteurs de croissance des cellules endothéliales, se présentant sous la forme de glycoprotéines homodimériques. Ils jouent un rôle majeur dans l'angiogenèse, qu'elle soit physiologique ou pathologique.

On en dénombre 6 membres : VEGF-A (ou VEGF), B, C, D, E et le PIGF ; qui se lient à des récepteurs de type tyrosine-kinase, entraînant la dimérisation et l'activation du récepteur, d'où la transduction de signaux. Le VEGF-A, qui a d'abord été étudié pour sa capacité à induire la perméabilité et l'épanchement vasculaire, est principalement impliqué dans l'angiogenèse, tandis que les VEGF-C et D le sont principalement dans la lymphangiogenèse. (Ellis, 2004)

❖ VEGF-A

Il s'agit du facteur pro-angiogénique le plus puissant connu. Il est également dénommé VEGF, ou encore VPF.

Le gène codant pour le VEGF-A comprend 8 exons et 7 introns. L'épissage alternatif explique l'existence d'au moins 4 isoformes : VEGF-121, 165, 189, et 206 aa (figure 10), qui se distinguent entre autres par leur capacité à lier l'héparine et l'héparane-sulfate (tableau 3). Un variant du VEGF-165 a été récemment identifié : le VEGF-165b, il inhibe l'angiogenèse. Le VEGF-165 est le plus efficace en terme d'induction de l'angiogenèse, et est l'isoforme prépondérante. Il est généralement surexprimé dans diverses tumeurs chez l'homme. (Ferrara *et al.*, 2003)

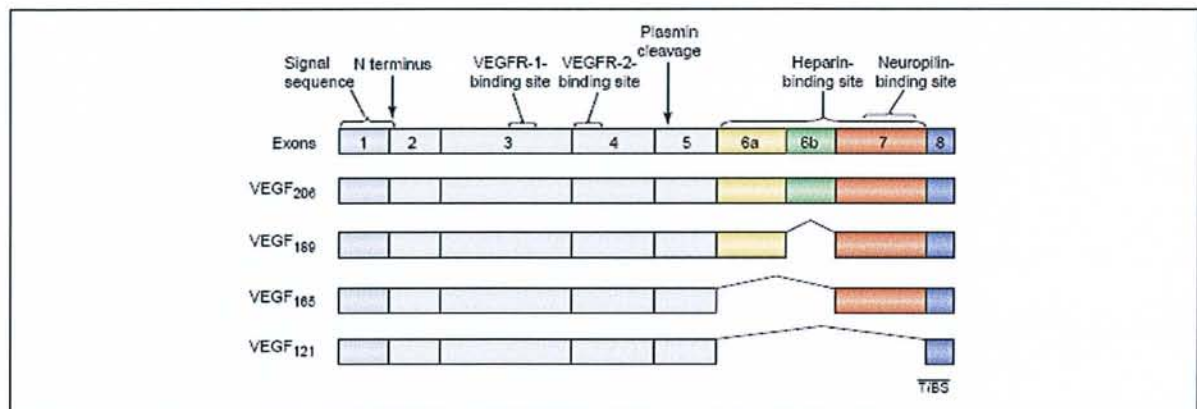


Figure 10 : Représentation des isoformes du VEGF-A, issues de l'épissage alternatif

(D'après Cross *et al.*, 2003)

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques et structurales des isoformes du VEGF-A

Isoforme(s) du VEGF-A concernée(s)	Caractère acide ou basique	Capacité à se lier à l'héparine	Situation
121	Acide	Non	Soluble, diffusible
189 et 206	Basique (résidus lysine et arginine)	Oui	Séquestrée au niveau de la MEC, par complexation avec des héparanes sulfate
165	Basique (résidus lysine et arginine)	Oui	Secrété et lié à la surface des cellules endothéliales ou à la MEC, par fixation sur l'héparine ou des glycosaminoglycanes à héparines

(D'après Cross *et al.*, 2003 ; Alitalo KK, 2004)

Les formes de VEGF-A, liées à la matrice, constituent ainsi une réserve tissulaire de VEGF-A inactif. La libération de ces isoformes latentes de la MEC se fait par clivage protéolytique post-traductionnel. Parmi les protéases impliquées, l'uPA, induite par le VEGF-A lui-même, est essentielle ; ainsi que l'héparanase, qui clive les héparines sulfates.

La transcription de l'ARNm du VEGF est induite par différents facteurs de croissance et cytokines (PDGF, EGF (*epidermal growth factor*), TNF α , TGF β , et Il-1 β), par l'activation de la cyclo-oxygénase 2, par l'hypoxie, aussi bien que par des forces mécaniques de stress. Une des caractéristiques du VEGF est son expression particulièrement forte en condition d'hypoxie. (Liekens *et al.*, 2001 ; Milkiewicz *et al.*, 2006).

Le VEGF-A était dénommé à l'origine *vascular permeability factor* (VPF), démontrant cette fonction très importante qu'il possède, d'augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui facilite l'extravasation de liquide et de protéines plasmatiques des vaisseaux sanguins. Le VEGF-A stimule les cellules endothéliales à produire des activateurs du plasminogène (uPA et tPA), l'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène et du collagène interstitiel. Il induit

ainsi un système équilibré de protéolyse qui peut remodeler des composés de la MEC nécessaires à l'angiogenèse.

Le VEGF-A stimule la prolifération des cellules endothéliales et leur migration via de nombreuses voies incluant l'activation des protéines kinases MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), ERK (*extracellular signal-regulated kinase*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*), et des membres de la famille RhoGTPase. (Papetti *et al.*, 2002)

Il agit comme facteur de survie des cellules endothéliales via l'activation de la voie de la kinase phosphatidyl-inositol 3 (PI3K/AKT, phosphatidylinositol-3 kinase/ AKT) et via son association avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ et l'activation de kinases d'adhésion focale (FAK, *focal adhesion kinase*). (Milkiewicz *et al.*, 2006)

Le VEGF-A est également susceptible de stimuler la lymphangiogenèse.

Le VEGF-A s'exprime par l'activation de récepteurs du VEGF décrits plus loin : les VEGFR-1 et 2. (Alitalo KK, 2004)

❖ **VEGF-B**

Structurellement proche du VEGF-A, il se lie également au VEGFR-1.

Le VEGF-B est produit en grande quantité par le myocarde en développement, les graisses, muscles, os, le pancréas, les glandes surrénales, et par les cellules musculaires lisses de plusieurs larges vaisseaux.

Sa production est relativement stable, et n'est pas augmentée par les mêmes facteurs que ceux induisant celle de A.

On distingue 2 variants, issus de l'épissage alternatif.

- VEGF-B 167 : se lie à l'héparane sulfate, et à NRP-1 (neuropiline 1)
- VEGF-B 186 : soluble, se lie à NRP-1 s'il y a eu clivage protéolytique

Dans la plupart des tissus, c'est l'isoforme 167 que l'on retrouve. Cependant, la production de 186 est tout de même très importante dans un cas : au niveau des tumeurs humaines primaires.

Il y a également formation d'hétérodimères, avec le VEGF-A.

Des niveaux élevés des VEGF-B et C ont été associés à la formation de métastases dans les nodules lymphatiques du cancer colorectal, mais son rôle dans la progression tumorale n'a pas été complètement éclairci. (Cross *et al.*, 2003)

❖ **VEGF-C**

Ce facteur de croissance présente 30 % d'homologie avec le VEGF-A. Il s'agit d'une protéine précurseur, qui après un processus protéolytique, va engendrer plusieurs formes, avec une affinité croissante pour VEGFR-2 et 3.

Les propriétés de VEGF-C présentent des similarités avec celles de A : au niveau de la migration des cellules endothéliales, et de la perméabilité vasculaire. Il se lie au VEGFR-2 principalement.

Le VEGF-C peut également se lier au VEGFR-3, localisé surtout au niveau des vaisseaux lymphatiques.

Selon le contexte biologique, on ira plutôt vers la formation de nouveaux vaisseaux de type vasculaire, ou lymphatique ; cela dépendra notamment du degré de protéolyse et de l'expression du VEGFR.

L'hypoxie n'entre pas en jeu dans sa régulation, contrairement aux facteurs de croissance suivants : PDGF, EGF et TGF β , et aux cytokines inflammatoires suivantes : IL-1 et TNF α . (Alitalo KK, 2004)

❖ **VEGF-D**

Il présente 61 % d'homologie avec le C, et interagit avec les mêmes récepteurs VEGFR-2 et 3.

Il s'agit également d'une protéine précurseur, capable de se lier directement au VEGFR-3. Après activation par des protéases, VEGF-D sera à même de se lier au VEGFR-3 avec une plus forte affinité, puis au VEGFR-2 si la protéolyse se poursuit.

Ce facteur de croissance est exprimé au niveau du cœur, des poumons, des muscles squelettiques, du côlon et de l'intestin grêle.

Il présente un effet mitogène sur les cellules endothéliales. (Ferrara *et al.*, 2003)

❖ **VEGF-E**

Un homologue du VEGF, le VEGF-E, a récemment été découvert dans le génome du parapoxvirus, le virus d'Orf, qui infecte les moutons, les chèvres, et parfois les humains. L'infection par ce virus cause des lésions prolifératives de la peau qui nécessitent d'abord une

prolifération et une dilatation capillaires. Le génome du virus code pour différentes formes du VEGF-E, qui lient spécifiquement le VEGFR-2 et la NRP-1 et peuvent stimuler la prolifération des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire. Le VEGF-E n'est pas essentiel pour la réplication virale mais joue un rôle important en modulant l'environnement de l'hôte pendant l'infection. (Cudmore *et al.*, 2006)

❖ **Placenta Growth Factor (PlGF)**

Comme son nom le laisse deviner, ce facteur de croissance a été découvert au niveau du placenta. Mais il peut également être détecté au niveau du cœur, des poumons, de la thyroïde, des muscles squelettiques, et de plusieurs tumeurs.

Ce facteur de croissance active uniquement les récepteurs de type VEGFR-1, en s'y liant. Il présente 50 % d'homologie avec le VEGF-A. Son activité mitogène et son pouvoir d'augmentation de la perméabilité sont cependant plus faibles que ceux de ce dernier.

Une fois activées, les cellules endothéliales produisent d'importantes quantités de PlGF, phénomène important pour l'angiogenèse dépendante de VEGF-A. (Ferrara *et al.*, 2003)

Plusieurs mécanismes semblent être impliqués dans l'amplification de l'angiogenèse contrôlée par le VEGF-A :

- PlGF peut entrer en compétition avec le VEGF-A pour VEGFR-1, permettant au VEGF-A d'interagir avec VEGFR-2, ce qui favorise l'angiogenèse.
- La liaison de PlGF à VEGFR-1 peut également augmenter cette angiogenèse contrôlée par VEGF-A, par une activation croisée de VEGFR-2.
- Les hétérodimères VEGF-A-PlGF impliquent la formation d'hétérodimères au niveau des récepteurs, stimulant une réaction croisée entre VEGFR-1 et VEGFR-2.

Le PlGF n'a aucun effet sur le développement embryonnaire, mais la perte de PlGF affaiblit l'angiogenèse associée aux tumeurs et mène à une cicatrisation prolongée.

Ainsi, la fonction du PlGF chez l'adulte semble être restreinte à la formation pathologique des vaisseaux, et est donc susceptible de servir de cible au niveau thérapeutique. (Alitalo KK, 2004)

2.2.1.2.1.2) Les récepteurs au VEGF

Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Ils comportent 7 domaines transmembranaires, et deux domaines intracellulaires à activité tyrosine kinase. La partie extracellulaire du récepteur comporte sept domaines de type immunoglobuline, et lie le VEGF.

On distingue trois types de récepteurs au VEGF : VEGFR-1, 2 et 3. Le VEGFR-1 est exprimé au niveau des cellules souches hématopoïétiques, des macrophages, des monocytes, ainsi qu'au niveau de l'endothélium vasculaire. Le VEGFR-2 est présent au niveau de l'endothélium vasculaire, ainsi qu'au niveau de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques. Le VEGFR-3 est présent uniquement au niveau des vaisseaux lymphatiques. (figure 11)

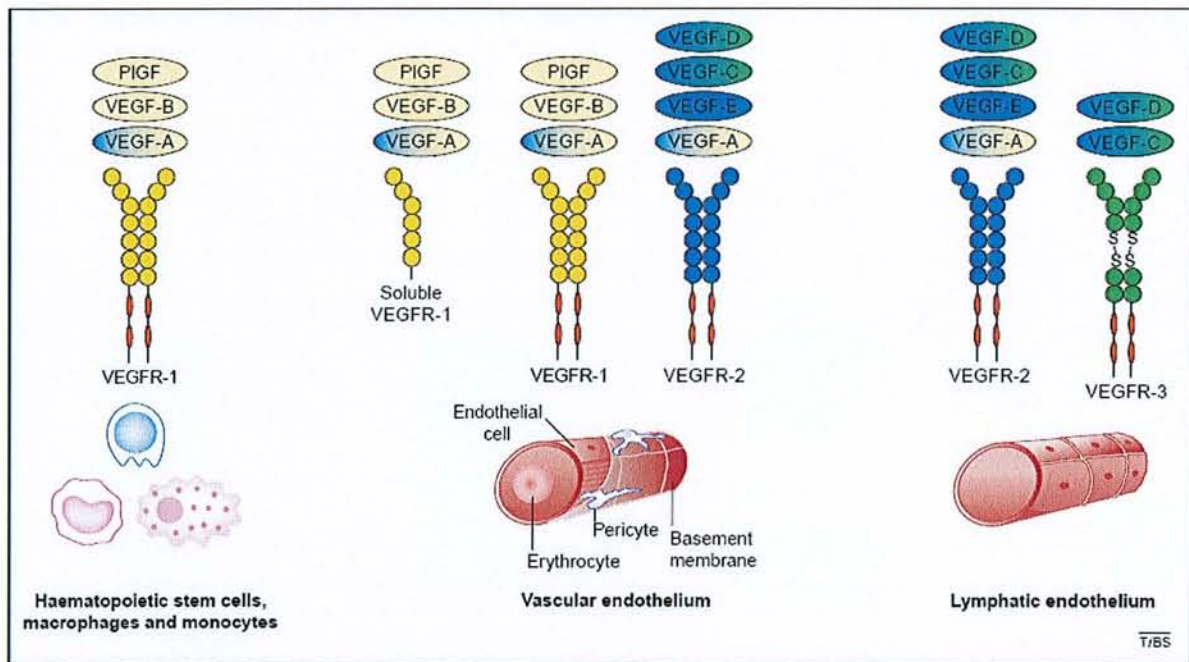


Figure 11 : Représentation schématique des différents récepteurs du VEGF, de leur profil d'expression ainsi que de leurs ligands respectifs.

En jaune sont représentés les ligands du VEGFR-1, en bleu ceux du VEGFR-2 et en vert ceux du VEGFR-3. Les ligands symbolisés par un ovale bicolore ont la capacité de se lier à deux récepteurs différents.

(D'après Cross *et al.*, 2003)

❖ **VEGFR-1**, également connu sous le nom de Flt-1 (= Fms-like tyrosine kinase-1)

Ce récepteur de 180 kDa, présente une affinité importante pour les VEGF-A et B, et le PIGF. Il est présent également au niveau d'autres types cellulaires tels que monocytes, macrophages, et cellules souches hématopoïétiques.

La fonction précise de ce récepteur fait toujours l'objet d'études. Les données conflictuelles le concernant semblent provenir du fait que ses fonctions et sa signalisation dépendent du stade de développement. Le VEGF n'induit qu'une faible activité tyrosine kinase du VEGFR-1. Son expression est augmentée par l'hypoxie, selon un mécanisme dépendant du facteur de transcription HIF1 (*hypoxia-inducible factor 1*), détaillé plus loin. (Gerber *et al.*, 1997)

Ce récepteur agit comme un régulateur négatif de l'activité du VEGF, en empêchant sa fixation sur le VEGFR-2. En effet, en l'absence de ce récepteur, on assiste à une augmentation du nombre de précurseurs endothéliaux. Les souris sans VEGFR-1 meurent aux environs du 8^{ème} ou 9^{ème} jour, les vaisseaux se trouvant bouchés à cause de la prolifération excessive des cellules endothéliales.

Il existe également un variant soluble de ce récepteur, variant sécrété par les cellules endothéliales. La partie intra-cellulaire, au niveau transmembranaire, est absente. Il est très exprimé au niveau du placenta, pendant la grossesse. Il lie le VEGF-A avec une haute affinité. Ainsi, celui-ci n'interagira pas avec le VEGFR fonctionnel.

❖ **VEGFR-2**, également connu sous le nom de Flk-1/KDR (*fetal liver kinase 1/ kinase domain-containing receptor*)

C'est le premier récepteur endothélial activé au début de l'embryogenèse. Il lie le VEGF-A, et les formes clivées de C, D et E.

Il est présent à la fois au niveau des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques.

Il est essentiel au développement vasculaire ; en effet, un embryon sans VEGFR-2, meurt au bout du 8^{ème} ou 9^{ème} jour, par défaut de précurseurs endothéliaux et hématopoïétiques.

L'affinité du VEGF-A pour le VEGFR-1 est dix fois plus grande que pour le VEGFR-2, dans les cellules endothéliales. Néanmoins, d'après le compte-rendu de la 4^e euroconférence sur l'angiogenèse, tenue à Helsinki en 2004, il s'agit du médiateur le plus important pour les effets physiologiques et pathologiques du VEGF A, au niveau des cellules endothéliales vasculaires, en terme de prolifération, survie, migration, et perméabilité :

- Voie de la prolifération cellulaire :

L'autophosphorylation du VEGFR-2 entraîne la phosphorylation de la phospholipase C, qui génère le diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP3). Le DAG active les protéines kinases C, qui, elles, activent la voie des MAPKs, et stimulent la prolifération cellulaire.

- Voie de la migration cellulaire :

La p38-MAPK, la FAK et la paxilline sont décrites comme des voies de signalisation induites par la liaison VEGF-VEGFR-2. Ces effecteurs jouent un rôle au niveau du turn-over du réseau d'actine dans le cytosquelette, et sont impliqués dans la migration cellulaire.

- Survie cellulaire par activation de la voie PI3K

L'activation de la PI3K permet la formation de phosphatidylinositol triphosphate et l'activation de la Ser/Thr kinase AKT. La survie cellulaire est favorisée par l'inhibition par AKT des voies pro-apoptotiques (BAD : Bcl-xL/Bcl-2-Associated Death Promoter) ou par la stimulation des voies anti-apoptotiques (bcl2).

Ces différentes voies sont notamment illustrées par la figure 12 :

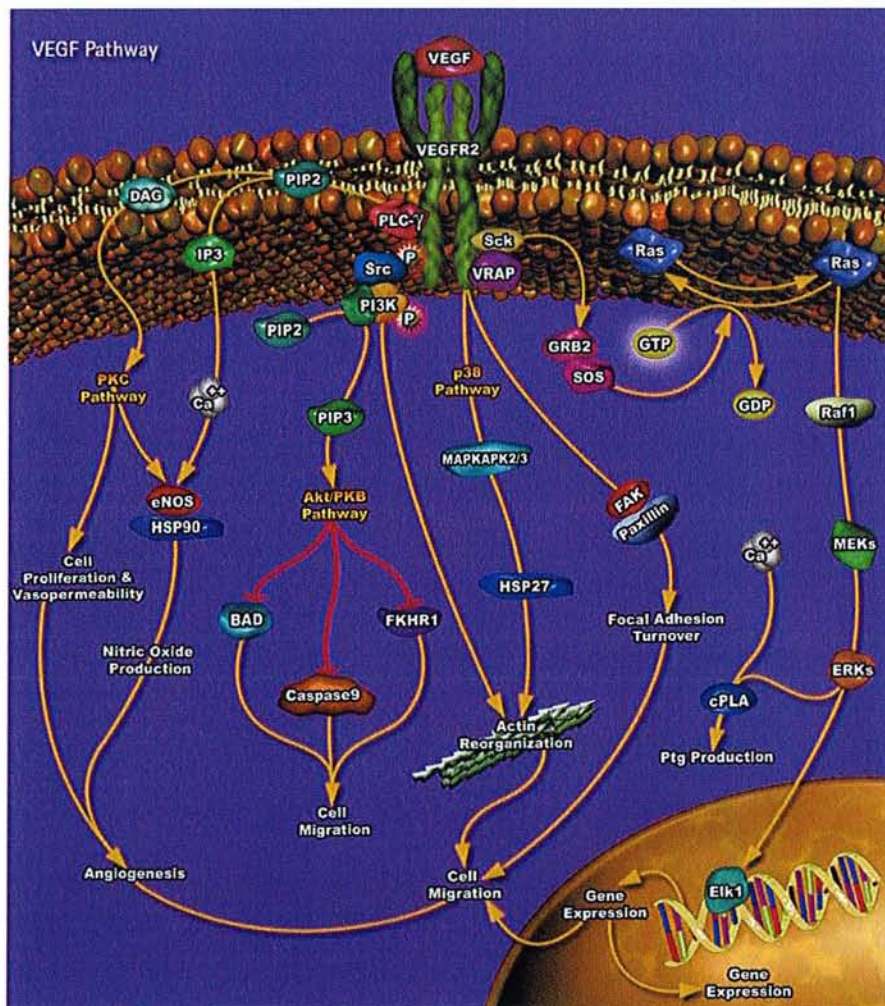


Figure 12 : Signalisation intra-cellulaire induite par le VEGF via le VEGFR-2

(D'après <http://6>)

❖ VEGFR-3

Ce récepteur lie les VEGF-C et D.

Chez l'embryon, il est exprimé au niveau de tous les vaisseaux. Pendant le développement, l'expression au niveau des vaisseaux sanguins diminue, et devient restreinte aux vaisseaux lymphatiques. (Alitalo KK, 2004)

2.2.1.2.1.3) Les co-récepteurs du VEGF

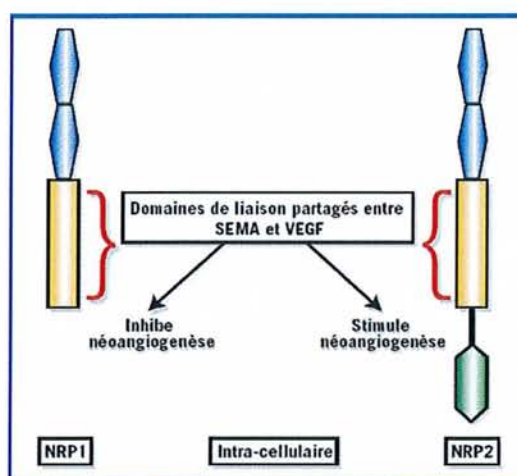


Figure 13 : Les neuropilines, des récepteurs bifonctionnels

(D'après Tobelem, 2006)

Les neuropilines 1 et 2 (NRP-1, NRP-2) sont des récepteurs membranaires capables de lier deux ligands différents : les sémaphorines de classe 3 (SEMA3F) et les VEGFs, pour réguler deux processus fondamentaux : la guidance neuronale et l'angiogenèse. (figure 13) Selon le ligand, les réponses cellulaires seront différentes, ce qui fait toute l'originalité et la complexité des NRPs.

Le couple NRP/VEGF favorise la néoangiogenèse tumorale

Les gènes NRP-1 et NRP-2 partagent des structures voisines mais diffèrent dans leur expression et leur régulation, et les protéines NRP-1 et -2 diffèrent dans leur ligand.

NRP-1 fixe le VEGF-B, le VEGF-E et le PLGF ; NRP-2 fixe une isoforme plus courte de VEGF : le VEGF-145, et le VEGF-C.

NRP-1 fonctionne comme un co-récepteur du VEGFR-2 qui augmente la fixation du VEGF-165 à son récepteur principal le VEGFR-2, ce qui induit une augmentation de la migration des cellules endothéliales. NRP-1 module également l'augmentation de perméabilité vasculaire induite par le VEGF.

En fait, les deux récepteurs NRP et VEGFR forment en présence de ligands un complexe moléculaire qui se traduit par une réponse cellulaire accrue. (Byrne *et al.*, 2005).

L'expression des NRPs est différente selon les cellules. Si les cellules endothéliales vasculaires expriment les deux formes de NRP, les cellules endothéliales lymphatiques n'expriment que NRP-2 et les cellules épidermiques, NRP-1.

Les carcinomes (prostate, sein, vessie, rein, colon, pancréas, ovaire et poumon) expriment NRP-1 alors que les tumeurs neuronales et les mélanomes expriment NRP-2.

L'expression combinée des deux NRPs semble corrélée à un très mauvais pronostic dans les cancers pulmonaires à petites cellules.

Une surexpression de NRP-1 dans les cellules de cancer de prostate accélère leur développement tumoral par augmentation du potentiel angiogénique. A l'inverse, l'utilisation d'une forme tronquée soluble de NRP-1 agit comme un antagoniste du VEGF et inhibe l'angiogenèse et la progression tumorale.

Ainsi le couple NRPs/VEGF joue un rôle important dans la néoangiogenèse tumorale.

Le couple NRP/sémaphorine inhibe l'angiogenèse et la progression tumorale
SEMA3F et VEGF partageant les mêmes domaines de liaison des NRPs, ils se comportent l'un vis-à-vis de l'autre comme des inhibiteurs compétitifs. Ainsi deux ligands différents peuvent se lier aux mêmes récepteurs tout en induisant des réponses cellulaires opposées. La migration et l'adhésion des cellules endothéliales sont effectivement inhibées par la SEMA3F. La transfection de SEMA3F dans des cellules tumorales réduit leur capacité à former des colonies, stimule leur apoptose et réduit leur prolifération. SEMA3F se comporte comme un suppresseur de métastases. Il apparaît clair que SEMA3F présente un vrai potentiel thérapeutique dans les tumeurs qui expriment NRP.

La figure 14 présente un schéma récapitulatif le rôle des différents acteurs du système VEGF/VEGFR.

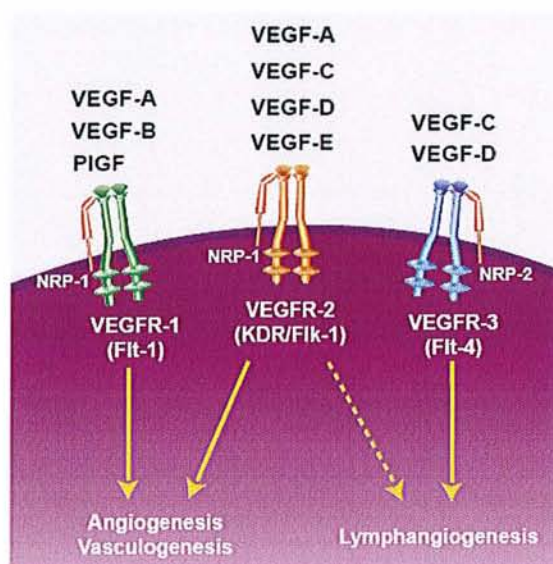


Figure 14 : Les différents facteurs de croissance endothéliaux vasculaires, leurs récepteurs et co-récepteurs (D'après Alitalo KK, 2004)

2.2.1.2.2) Angiopoïétines

❖ Angiopoïétine 1 : Ang 1

L'Ang 1 est une protéine glycosylée de 70 kDa. Elle est formée de deux régions : la région aminoterminal, qui contient un motif de type *coiled-coil* caractéristique des protéines capables de s'hétérodimériser ; et la région carboxyterminale, homologue au fibrinogène.

L'Ang1 se lie à Tie2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2*) et active sa phosphorylation.

Au cours du développement embryonnaire de la souris, son expression est localisée au niveau du myocarde et du mésenchyme à un stade précoce, et à un stade ultérieur dans les cellules autour des vaisseaux en développement. La perte du gène codant pour l'Ang1 conduit à une létalité des embryons au stade 12,5 jours, ce qui est vraisemblablement la conséquence de modifications profondes de l'architecture vasculaire. (Yancopoulos *et al.*, 2000)

Par ailleurs, le ciblage de l'Ang1 dans la peau de souris transgéniques, entraîne une augmentation du diamètre des vaisseaux sans extravasation : il n'y pas de signe de perméabilité. (Suri *et al.*, 1996)

L'implication de l'Ang1 dans l'angiogenèse semble indirecte, par induction au niveau des cellules endothéliales des facteurs responsables du recrutement des cellules mésenchymateuses (cellules accessoires, péricytes). Ang1 participe donc ainsi à la maturation des vaisseaux.

Certaines données indiquent que l'Ang1 peut aussi contribuer au remodelage vasculaire en l'absence de cellules mésenchymateuses accessoires.

Différents autres types d'angiopoïétines ont été identifiés, incluant les angiopoïétines 2, 3, 4 et 5 (Ang2, Ang3, Ang4 et Ang5). Cependant, s'il est établi que l'Ang2 est un antagoniste de l'Ang1, le rôle des autres angiopoïétines n'est pas clairement connu.

Signalisation induite par Ang 1 dans les cellules endothéliales :

- Voie PI3K/AKT

Tie2 phosphorylé peut interagir avec la sous-unité p85 de la PI3 kinase, ce qui conduit à son activation, puis à celle de la protéine kinase AKT. Ainsi, Ang1 induit la survie des cellules endothéliales, via l'activation de la voie PI3K/AKT. Ang1 induit également le bourgeonnement des cellules endothéliales via l'activation de la PI3K et de FAK. (Kim *et al.*, 2000)

- La voie de la protéine Bmx

Bmx est une tyrosine kinase, stimulée par l'activation de Tie2. Cette protéine est impliquée dans l'adhésion et la migration des cellules endothéliales. Bmx pourrait donc être le lien entre Tie2 et le cytosquelette. (Rajantie *et al.*, 2001)

- La voie des transducteurs du signal, et activateurs de la transduction (STATs, *signal transducers and activators of transcription*)

L'activation de Tie2 peut aussi conduire à l'activation des STATs, tels que STAT3 et STAT5, impliqués dans la régulation de la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. (Korpelainen *et al.*, 1999)

❖ Angiopoïétine 2 : Ang 2

Ang 1 et Ang 2 présentent environ 60 % d'homologie, et toutes deux se lient à Tie2 avec la même affinité. Cependant, Ang2 n'est pas capable d'induire une auto-phosphorylation de Tie2.

Ang2 inhibe la phosphorylation de Tie2 induite par Ang1. Ang2 serait donc un facteur proangiogène qui, par sa fonction d'antagoniste à la fonction stabilisatrice de Ang1, rendrait l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à des facteurs angiogènes comme le VEGF (Pepper, 2000). En l'absence de VEGF, Ang2 déstabilise les vaisseaux, entraînant finalement la régression des vaisseaux.

L'expression de l'Ang2 est significativement corrélée à un mauvais pronostic allant de pair avec une angiogenèse tumorale très importante. Ceci est encore plus prononcé, quand l'expression du VEGF est élevée dans ces tumeurs.

Il semble donc que le ratio Ang1/Ang2, ainsi que la présence ou l'absence de VEGF soient deux paramètres importants dans la régulation de l'angiogenèse.

❖ Récepteurs Tie

Les récepteurs Tie1 et Tie2 sont des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Leur région extracellulaire est constituée de deux domaines de type immunoglobuline, trois domaines de type EGF répétés en tandem, et trois domaines de type fibronectine III.

Leur région intracellulaire est formée de domaines tyrosine kinase, séparés par l'insertion des kinases.

Aucun ligand pour Tie1 n'a été identifié à ce jour. Tie1 serait peut-être impliqué dans la modulation d'activité de Tie2, en formant des hétérodimères.

Il existe par contre quatre ligands connus pour Tie2 : Ang 1, 2, 3 et 4 ; que l'on peut classer en deux groupes.

- Ang 1 et 4, agonistes de Tie2 capables de s'y lier et d'induire ainsi l'auto-phosphorylation de ce récepteur
- Ang 2 et 3, ligands antagonistes de Tie2

2.2.1.2.3) FGF

❖ Structure

Les FGFs sont des facteurs de croissance au nombre de 24 isoformes. Les plus étudiés sont FGF-1 = aFGF = dit acide ; et FGF-2 = bFGF = dit basique.

Ces facteurs ont un poids moléculaire de 18kDa, et une homologie d'environ 50 %. Le rôle du FGF-1 semble moins important que celui du FGF-2.

Le FGF-2 est synthétisé sous différentes formes. (Ornitz & Itoh, 2001)

Les formes de haut poids moléculaire du FGF-2 (HPM FGF-2), de 21 à 24 kDa, ont une extension N-terminale riche en motifs GC présentant des arginines méthylées. Ces formes sont localisées préférentiellement dans le noyau.

A l'opposé, la forme standard du FGF-2 (d'un poids moléculaire de 18 kDa) ne comporte pas d'extension N-terminale. Cette isoforme est cytosolique ou associée à la membrane plasmique. Il a été montré que les différentes formes moléculaires ont des rôles et des mécanismes d'action distincts.

Les HPM FGF-2 contrôlent la prolifération cellulaire par un mécanisme intracellulaire indépendant d'un récepteur de surface, tandis que le FGF-2 de 18 kDa induit une migration cellulaire par la voie autocrine.

FGF-1 et FGF-2 stimulent l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*.

L'activation des cellules endothéliales par ces facteurs est nettement supérieure à celle du VEGF *in vitro*. Par exemple, l'effet du FGF-1 et du FGF-2 sur la prolifération des cellules endothéliales capillaires ou macrovasculaires est au moins deux fois supérieur à celui du VEGF. De même, le FGF-2 régule de manière très fine la production des activateurs du plasminogène, tandis que l'effet du VEGF est nettement plus modéré. Enfin, les formes exogènes et les formes endogènes du FGF-2 exprimées par les cellules stimulent fortement l'expression des intégrines *in vitro*. L'ensemble des données indique donc que plusieurs paramètres majeurs de l'angiogenèse sont régulés *in vitro* d'une manière très précise par le FGF.

Les FGF activent au niveau de la cellule endothéliale non seulement la voie classique des MAP kinases, mais aussi la p38 kinase qui semble jouer un rôle capital dans la morphogenèse tubulaire des vaisseaux capillaires. (Matsumoto *et al.*, 2002)

L'expression du FGF-2 est fortement associée à la densité microvasculaire dans des tumeurs synthétisant le FGF-2 comme les mélanomes cutanés ou les carcinomes prostatiques, et l'expression du FGFR-1 (récepteur 1 du FGF) est stimulée dans les vaisseaux angiogéniques. L'injection de molécules anti-sens pour le FGF-2 ou le FGFR-1 inhibe le développement de mélanomes. De même, l'injection d'adénovirus recombinant codant pour l'ADNc du récepteur soluble du FGFR-1 (qui inhibe l'activité des FGFs) chez des souris RipTag entraîne une inhibition de l'angiogenèse et du développement tumoral *in vivo*. (Compagni *et al.*, 2000)

Aussi, le traitement de souris présentant une xénogreffe de mélanome, avec des anticorps neutralisants inhibant à la fois FGF et VEGF, est plus efficace que le traitement avec un inhibiteur monospécifique inhibant seulement le VEGF.

Par ailleurs, une protéine de liaison du FGF-2, le FGF-BP1 (FGF binding protein 1), a été identifiée. Il a été proposé que cette molécule agisse comme un chaperon qui lie le FGF-2 et mobilise la molécule liée à la matrice extracellulaire pour stimuler l'angiogenèse. Le FGF-BP1 pourrait participer de cette manière au *switch* angiogénique, que nous détaillerons plus loin.

❖ Récepteurs

Ces deux facteurs se lient à des récepteurs de surface cellulaire spécifiques. Quatre types de récepteur à activité tyrosine kinase ont été caractérisés, dont les FGFR-1, les FGFR-2, les FGFR-3 et les FGFR-4, dont la structure est similaire à celle du VEGFR, avec un domaine extra-cellulaire contenant 3 boucles immunoglobulin-like (Ig-like), et un domaine tyrosine kinase interne divisé en 2.

La spécificité et l'affinité de ces récepteurs sont régulées par épissage alternatif d'exons codant pour la boucle extracellulaire Ig-like en 3'. Les cellules endothéliales expriment les récepteurs FGFR-1 et FGFR-2, et leur autophosphorylation est stimulée par le FGF-1 et le FGF-2. (Bikfalvi, 2003)

2.2.1.2.4) Autres

○ Les éphrines

La grande famille des récepteurs aux éphrines possède la spécificité d'avoir des ligands membranaires non circulants. Elle a été divisée en deux sous-familles, les ligands de type A, simplement accrochés aux membranes plasmiques ; et les ligands B, qui possèdent une partie cytoplasmique. (L'Allemain, 2000)

❖ Rôle des éphrines en angiogenèse

Les éphrines et leurs récepteurs ont d'abord et surtout été impliqués dans les processus neurodéveloppementaux qui ont lieu lors de l'embryogenèse.

En 1995, une première étude décrivait le rôle pro-angiogénique de l'éphrine A1 lors de l'angiogenèse inflammatoire induite par le TNF α . En 1999, un test d'angiogenèse *in vitro*

montrait que l'addition des éphrines B1 ou B2 seules induisait le bourgeonnement des structures de capillaires, et ce avec la même intensité que les plus forts facteurs angiogènes.

Chez les animaux invalidés soit pour les gènes codant les récepteurs EphB2 et EphB3, on a des embryons avec de multiples défauts d'angiogenèse au niveau des organes.

Ainsi, les couples éphrine-Eph participent à l'organisation des vaisseaux.

Les phénotypes présentés par ces animaux, à savoir la désorganisation des structures capillaires, rappellent ceux obtenus lorsque le récepteur angiogénique Tie2 ou son ligand Ang1 sont altérés. Cela suggère que la signalisation des couples éphrine-Eph de type B pourrait interagir avec celle issue de Ang1/Tie2. Un premier résultat allant dans ce sens est la phosphorylation *in vitro* du domaine cytoplasmique de l'éphrine B1 par le récepteur Tie2.

❖ Rôle des éphrines dans l'adhésion cellulaire

L'activation du couple EphA2-éphrine A1 suffit à supprimer la fonction des intégrines et des protéines associées aux plaques d'adhésion cellulaire.

○ Endothéline-1 et angiotensine II

L'endothéline-1 (ET-1) et l'angiotensine II (AngII) (figure 15) sont des peptides vasoactifs, mais aussi mitogènes et pro-angiogéniques. Tous deux exercent leurs actions par l'intermédiaire de récepteurs couplés aux protéines G : ET_A-R et ET_B-R (récepteurs de types A ou B de l'endothéline) pour ET-1 ; AT1R et AT2R (récepteurs de type 1 ou 2 de l'angiotensine II) pour AngII.

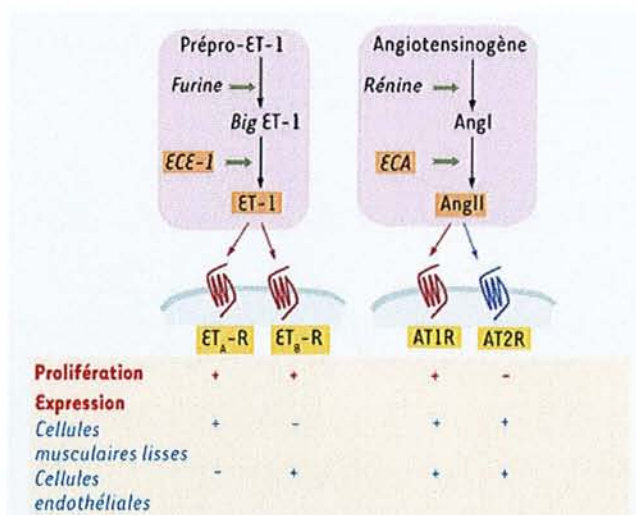


Figure 15 : Similitudes entre les étapes de synthèse de ET-1 et d'AngII, et modes d'action

(D'après Cazaubon *et al.*, 2006)

ET-1 et AngII agissent sur les différentes étapes de la progression tumorale, et l'utilisation d'antagonistes spécifiques de leurs récepteurs, ou d'inhibiteurs de leur synthèse, est efficace pour ralentir la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* dans différents modèles animaux.

Des essais cliniques utilisant des antagonistes d'ETA-R donnent des résultats encourageants pour le traitement antitumoral, et une approche similaire ayant pour objectif de bloquer ETB -R ou AT1R est envisageable.

- ❖ Expression des systèmes endothéline-1 et angiotensine II dans les tumeurs : des similitudes dans les deux systèmes

ET-1 et AngII ont d'abord été caractérisées pour leur vasoactivité.

L'ET-1 est essentiellement sécrétée par les cellules endothéliales, alors que l'AngII est produite dans la circulation, mais aussi localement, notamment à la surface des cellules endothéliales. Ces deux peptides sont produits par un mécanisme similaire, faisant intervenir la coupure enzymatique de précurseurs inactifs par une métalloprotéase.

Les deux peptides ET-1 et AngII ont de nombreuses cibles cellulaires, parmi lesquelles les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux. Ils exercent tous deux leurs actions par l'intermédiaire de récepteurs appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG, récepteurs couplés aux protéines G).

Dans le système ET-1, deux sous-types de récepteurs ont été identifiés, ET_A-R et ET_B-R, qui transmettent des effets vasoactifs opposés : vasoconstriction couplée à ET_A-R dans les cellules musculaires lisses, vasodilatation couplée à ET_B-R dans les cellules endothéliales. En revanche, tous deux sont capables de relayer l'effet mitogène d'ET-1.

AngII se lie également à deux récepteurs : AT1R, exprimé de façon prédominante chez l'adulte, et AT2R, exprimé chez le fœtus et dans des situations de remodelage tissulaire. Les effets physiologiques d'AngII sont majoritairement attribués à AT1R, AT2R étant considéré comme un récepteur régulateur. Comme ET-1, AngII régule positivement la prolifération et la migration cellulaire par l'intermédiaire d'AT1R, tandis qu'AT2R exerce un contrôle négatif sur ces fonctions.

Une expression de plusieurs des composants du système ET-1, et plus récemment du système AngII, a été mise en évidence dans différentes cellules cancéreuses. Outre une élévation de la synthèse du peptide, une régulation positive de l'expression du récepteur est couramment observée.

C'est ainsi qu'une augmentation de l'expression de composants du système ET-1 a pu être reliée à l'invasivité de certaines tumeurs (adénome colorectal, cancers du sein et de la prostate). Il en est de même pour l'expression du système AngII, notamment dans le cas de cancers de la peau ou de carcinomes cervicaux.

Les récepteurs d'AngII surexprimés dans les cellules tumorales sont essentiellement du sous-type AT1R, même si une augmentation de l'expression d'AT2R a été observée dans les cancers du sein, suggérant une éventuelle participation des deux sous-types de récepteurs à la progression tumorale.

Pour le système ET-1, la surexpression des récepteurs ET_A-R et ET_B-R est observée de manière différentielle selon le type cellulaire, la surexpression d'ET_A-R étant plus particulièrement notée dans les tumeurs d'origine épithéliale (carcinomes). De manière intéressante, les cellules tumorales expriment le plus souvent un sous-type de récepteur d'ET-1 différent de celui qui est exprimé par le tissu normal correspondant.

Outre les cellules tumorales, l'endothélium des vaisseaux intratumoraux exprime également ET_A-R, ET_B-R et/ou AT1R.

❖ Mécanismes d'action de l'endothéline-1 et de l'angiotensine II dans l'angiogénèse

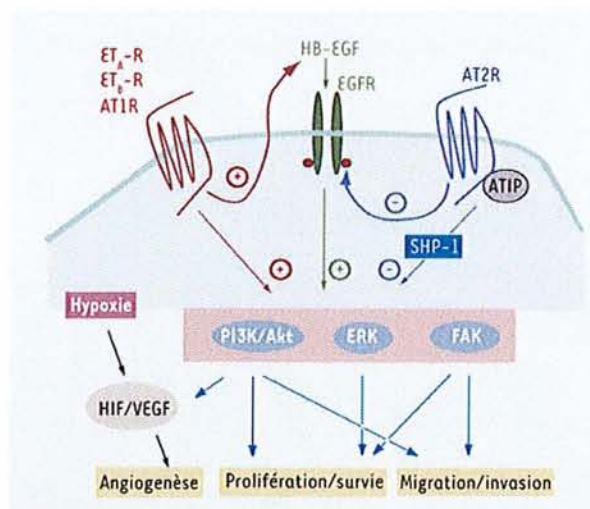


Figure 16 : Principales voies de signalisation intracellulaire, couplées aux récepteurs de ET-1 et de AngII, impliquées dans la progression tumorale

(D'après Cazaubon *et al.*, 2006)

Parallèlement aux facteurs angiogéniques VEGF, FGF ou HGF, ET-1 et AngII apparaissent aussi comme des acteurs de l'angiogenèse. (figure 16)

Ces deux peptides, en agissant directement sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire d'ET_B-R et d'AT1R, sont capables de moduler *in vitro* les étapes précoces de l'angiogenèse (prolifération, migration, invasion, production de MMPs), mais aussi l'étape, plus tardive, de tubulogenèse.

ET-1 et AngII, en activant respectivement ET_A-R et AT1R, sont également de puissants mitogènes pour les cellules musculaires lisses vasculaires. Au contraire, AT2R, par son action négative sur les voies de signalisation couplées à AT1R et au récepteur du VEGF, régule négativement la migration des cellules endothéliales et la tubulogenèse.

Il faut en outre noter qu'ET-1 et AngII stimulent indirectement l'angiogenèse tumorale *via* la production de VEGF, aussi bien par les cellules tumorales que par les cellules endothéliales. Cela implique notamment l'induction d'HIF-1 α , le facteur de réponse à l'hypoxie (*hypoxia-induced factor*) contrôlant la production de VEGF. Une augmentation de la sécrétion de VEGF par les macrophages associés à la tumeur et par les cellules stromales a également été observée en réponse à l'AngII. Réciproquement, le VEGF induit la sécrétion d'ET-1 par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, conduisant à une boucle d'amplification de la production de ces facteurs pro-angiogéniques.

Finalement, ET-1 comme AngII sont sécrétés en réponse à plusieurs stimuli associés au processus tumoral (hypoxie, cytokines inflammatoires, facteurs de croissance), et peuvent agir de concert avec le VEGF sur les différentes étapes de l'angiogenèse.

o La lactadhérine

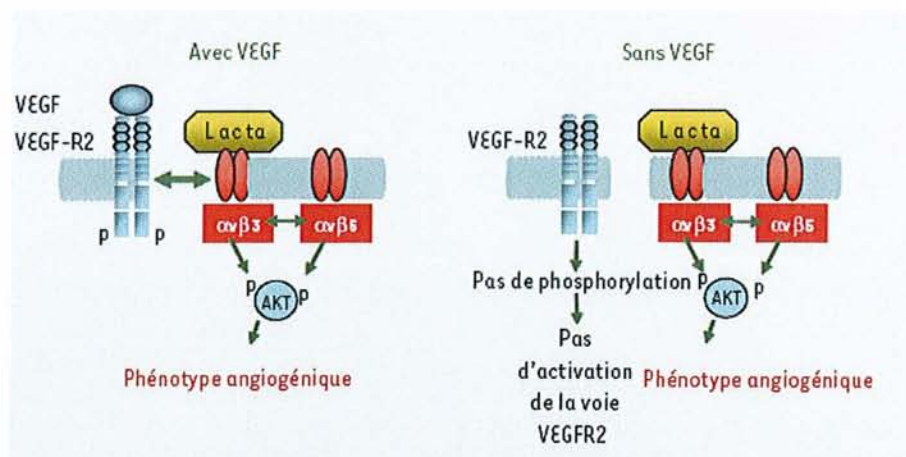


Figure 17 : La lactadhérine interagit avec l'intégrine $\alpha\beta 3$ pour activer le processus de néovascularisation (D'après Silvestre *et al.*, 2005)

Comme vu précédemment, le VEGF est un facteur de croissance majeur pour le développement des nouveaux vaisseaux sanguins. Il agit principalement par l'intermédiaire de son récepteur, le VEGFR-2, en activant de nombreuses voies de signalisation, notamment celles dépendantes des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$.

La lactadhérine est une glycoprotéine sécrétée par les glandes mammaires. Son rôle physiologique reste obscur. Elle est impliquée dans la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages, elle présente des homologues de séquence avec une protéine pro-angiogénique Del-1, et possède une séquence RGD (séquence arginine-glycine-acide aspartique) lui permettant de se lier aux intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$.

En présence de VEGF, la phosphorylation de son récepteur, le VEGFR-2, permet la formation d'un complexe trimoléculaire VEGFR-2/lactadhérine/intégrine $\alpha\beta3$ qui initie le processus angiogénique. En l'absence de VEGF, la lactadhérine, en interagissant directement avec l'intégrine $\alpha\beta3$, est capable d'initier le développement de nouveaux vaisseaux sanguins. (figure 17)

L'ensemble de ces propriétés conférerait donc à la lactadhérine un potentiel pro-angiogénique.

Pour étayer cette hypothèse, l'équipe de JS Silvestre a analysé, dans un premier temps, l'expression de la lactadhérine dans le tissu vasculaire. L'ARN et la protéine ont été détectés dans l'aorte murine et humaine, soulignant son rôle éventuel dans le développement de nouveaux vaisseaux.

Un certain nombre d'outils ont alors été développés, et une lignée de souris déficientes pour la lactadhérine créée, afin d'analyser l'implication de cette molécule dans le développement des néovaisseaux. (Silvestre *et al.*, 2005)

❖ Rôle de la lactadhérine dans l'angiogenèse induite par le VEGF

Dans un premier temps, son potentiel proangiogénique a été testé dans un modèle d'angiogenèse *in vivo*. Le VEGF y induit une forte infiltration de cellules, essentiellement de type endothélial. Cette équipe a montré que l'utilisation d'un anticorps anti-lactadhérine ou de souris déficientes en lactadhérine atténue totalement l'effet pro-angiogénique du VEGF.

❖ Mécanisme d'action de la lactadhérine

Les effets chimiotactiques et mitogéniques du VEGF sont classiquement contrôlés par les protéines kinases ERK et AKT. Dans le muscle ischémié, comme dans des cultures de cellules endothéliales humaines, il apparaît que l'effet du VEGF sur la phosphorylation d'AKT est bloqué par l'inhibition ou l'absence de lactadhérine.

○ La famille Ets

La mise en place de vaisseaux sanguins est un phénomène essentiel au développement embryonnaire, au remodelage tissulaire et au développement tumoral chez l'adulte.

Les molécules impliquées dans ce processus sont nombreuses, depuis les facteurs de croissance des cellules endothéliales et ceux impliqués dans la maturation vasculaire, jusqu'aux effecteurs de l'inflammation et de la coagulation ; pourtant, les mécanismes contrôlant l'expression de leurs gènes au cours de l'angiogenèse sont encore peu connus.

Les cellules endothéliales forment les nouveaux capillaires à l'origine des futurs vaisseaux sanguins. Elles expriment un répertoire spécifique de marqueurs qui leur donne une identité « endothéliale ». Dans les gènes de certains de ces marqueurs ont été identifiées des zones de régulation responsables de l'expression spécifique dans les cellules endothéliales. Certains facteurs de transcription de la famille Ets participent à la détermination de cette spécificité d'expression et aussi à la régulation basale de ces gènes.

❖ La famille Ets

La famille des facteurs Ets est composée de plusieurs dizaines de molécules qui ont en commun un domaine de fixation à l'ADN appelé ETS. Ce domaine est composé d'environ 85 acides aminés et forme une « hélice-boucle-hélice » qui permet la reconnaissance d'une séquence d'ADN dont le motif central est GGAA/T, nommé *Ets-binding site* (EBS). Les régions situées de part et d'autre de ce motif sont importantes pour la spécificité d'interaction des facteurs Ets avec l'ADN.

La plupart des membres de la famille Ets active la transcription.

Une fonction pour certains facteurs Ets dans la mise en place et le développement vasculaire a été suggérée suite aux études de leur expression pendant le développement normal et tumoral. De ces études, il ressort que quatre membres de la famille Ets : *Ets1*, *Fli1*, *Tel* et *Erg*, sont particulièrement intéressants dans le cadre de l'étude de l'angiogenèse.

❖ Expression des facteurs Ets pendant l'angiogenèse

Chez l'adulte, l'expression de *ets1* est détectée lors de l'angiogenèse induite pendant la cicatrisation et le développement tumoral.

In vitro, les observations montrent également que l'expression de *ets1* est corrélée à l'activation de l'endothélium ; *ets1* est exprimé dans les cellules endothéliales qui prolifèrent et qui migrent, mais pas après que ces cellules aient atteint la confluence. Cette expression est augmentée dans les cellules endothéliales stimulées par différents facteurs angiogéniques, mais aussi dans les cellules musculaires lisses stimulées par l'endothéline 1 et le PDGF. L'expression de *tel* est détectée dans les cellules endothéliales pendant la formation de tubes et il semblerait que le VEGF l'inhibe.

❖ Les gènes *tie*

Comme vu précédemment, les gènes *tie1* et *tie2* codent des récepteurs à tyrosine kinase exprimés dans l'endothélium des vaisseaux sanguins pendant le développement embryonnaire et chez l'adulte. L'inactivation de l'un ou l'autre induit des défauts sévères dans le développement vasculaire.

Les expériences ont révélé que deux régions contenant des doubles EBS sont critiques pour l'activité basale du promoteur *tie1 in vitro*, et au moins une de ces régions l'est également *in vivo*.

❖ Le gène *VE-cadhérine*

La VE-cadhérine est une protéine transmembranaire qui permet l'adhérence intercellulaire homophile et dépendante du calcium ; elle est spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales *in vivo*. L'inactivation du gène *VE-cadhérine* entraîne une mort embryonnaire avec une absence de différenciation des îlots sanguins en réseau vasculaire primaire dans le sac vitellin.

L'analyse d'une région très proximale du promoteur de gène de la VE-cadhérine révèle la présence de deux EBS essentiels à l'expression basale du gène puisque leur mutation réduit fortement l'activité du promoteur.

Un rôle du facteur Erg dans le contrôle du gène de la VE-cadhérine a été proposé et la surexpression de *Ets1* dans les cellules endothéliales et fibroblastes de souris induit également une surexpression de la VE-cadhérine *in vitro*.

Des expériences de transactivation utilisant un fragment de 2,5 kb du promoteur ont révélé que Ets1 augmentait l'activité du promoteur par les deux EBS précédemment localisés dans la région proximale.

Ces données suggèrent que Ets1 pourrait être impliqué dans le contrôle de l'expression du gène de la VE-cadhérine *in vivo*. Cependant, à la différence de Ets1, l'expression de la VE-cadhérine est maintenue dans l'endothélium quiescent, suggérant que d'autres facteurs de transcription sont requis pour le maintien de cette expression après la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

❖ Les gènes *flt1* et *flk1* (= *vegfr-1* et *vegfr-2*)

Flt1 et Flk1 sont deux récepteurs au VEGF dont l'expression est pratiquement restreinte aux cellules endothéliales vasculaires. L'inactivation du gène de l'un ou l'autre de ces récepteurs entraîne un développement vasculaire anormal.

L'analyse du promoteur du gène *flt1* a permis d'identifier un fragment qui porte une forte activité transcriptionnelle *in vitro* et qui s'exprime spécifiquement dans les cellules endothéliales après infection par adénovirus. Un EBS localisé dans la région de 90 bp située en amont du site d'initiation de transcription est nécessaire pour l'activité du promoteur.

Ets1, Ets2 et Erg sont capables de stimuler l'activité transcriptionnelle de cette région du gène *flt1*.

De plus, une corrélation significative entre l'expression des protéines Ets1 et Flt1 dans les cellules endothéliales microvasculaires de gliomes humains a été observée, suggérant que Ets1 pourrait effectivement réguler la transcription du gène *flt1 in vivo*.

Les propriétés *in vitro* et *in vivo* des différents facteurs ETS évoqués suggèrent qu'ils jouent un rôle dans le contrôle de l'expression spécifique de gènes importants pour l'angiogenèse dans les cellules endothéliales. Cependant, la multiplicité des facteurs ETS peut rendre délicates les interprétations des rôles distincts de chaque facteur. (Lelièvre *et al.*, 2001)

2.2.1.3) Acteurs anti-angiogènes

Le processus d'angiogenèse est finement régulé par des facteurs pro et antiangiogéniques. Chez l'adulte, les facteurs angiogéniques restent exprimés à un faible taux dans les cellules normales, ou sont co-exprimés avec des facteurs inhibiteurs. L'équilibre entre ces deux

activités contribue à maintenir la quiescence de l'endothélium. Le tableau 4 nous présente une liste de facteurs anti-angiogéniques présents dans le corps humain.

Tableau 4 : Facteurs anti-angiogéniques connus

FACTEURS ANTI-ANGIOGENIQUES
Angiostatine
Antithrombine III
Canstatine
Inhibiteur dérivé du cartilage
Fragment CD59 du complément
Endostatine
Fibronectine
Gro-beta
Héparinases
Fragment hexasaccharidique de l'héparine
hCG (hormone chorionique gonadotrope)
Interferon $\alpha/\beta/\gamma$
IP-10 (interferon inducible protein)
IL-12
Kringle 5
TIMPs
2-ME (2 méthoxyestradiol)
PF4
Fragment de 16kD de la prolactine
Rétinoïdes
Tétrahydrocortisol-S
Tumistatine
Vasculostatine
Vasostatine

(<http://5>)

2.2.1.3.1) Famille des thrombospondines

- La thrombospondine 1 (TSP1) appartient à une famille de glycoprotéines produites par nombre de cellules normales et transformées. Il a été montré que la TSP1 est un inhibiteur puissant de l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* et joue un rôle dans le switch angiogénique. (Lawler, 2002)

Par exemple, la surexpression de TSP1 dans des lignées cellulaires A431 et SCC13 inhibe fortement le développement tumoral *in vivo* chez la souris sans pour autant modifier la croissance *in vitro*. La perte d'un gène suppresseur de tumeur dans les fibroblastes de hamster induit aussi une réponse angiogénique par diminution de la sécrétion de la TSP1. La nature du gène suppresseur capable de réguler l'expression de TSP1 a été élucidée en utilisant les

fibroblastes isolés de patients présentant la maladie de Li-Fraumeni. Il s'agit de la protéine p53. Finalement TSP1 est régulé par Id1 qui est aussi un répresseur de sa transcription.

TSP1 inhibe l'angiogenèse tumorale grâce à des effets directs sur la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales, mais aussi grâce à des effets indirects sur la mobilisation des facteurs proangiogéniques. En effet, elle est capable de lier et d'activer CD36 à la surface des cellules endothéliales et d'empêcher la mobilisation du VEGF de la cellule tumorale vers la cellule endothéliale grâce à une inhibition de l'activation de MMP-9. TSP1 inhibe le développement des vaisseaux sanguins, mais non celui des vaisseaux lymphatiques. En effet, les souris transgéniques présentant une surexpression cutanée de la TSP1 montrent une inhibition des métastases hématogènes mais non celle des métastases ganglionnaires lymphatiques en raison de l'absence de CD36 au niveau de l'endothélium lymphatique.

- L'expression de la TSP2, contrairement à celle de la TSP1, est induite dans un modèle de carcinogenèse cutanée au niveau du stroma tumoral. Les souris TSP2^{-/-} ont un développement tumoral accéléré dans le même modèle tumoral. La TSP2 semble donc participer à un mécanisme de *défense* antitumorale de l'hôte. Par ailleurs, son expression dans des cellules tumorales A431 entraîne une forte inhibition du développement tumoral *in vivo* sans altérer la croissance ou la survie *in vitro*. L'effet semble être additif, voire synergique, avec la TSP1. Aussi, le relargage continu systémique de TSP2 par des implants de fibroblastes transfectés avec l'ADNc de la TSP2 chez la souris entraîne-t-il une inhibition considérable de la croissance tumorale *in vivo*. (Hawighorst *et al.*, 2001)

2.2.1.3.2) Angiostatine et endostatine

- L'angiostatine a été découverte et isolée à partir d'urine de souris présentant une tumeur pulmonaire de Lewis.

L'angiostatine est un fragment de la plasmine de 56 kDa représentant quatre boucles *Kringle*. Son action est principalement endothéliale. Récemment, le rôle des différentes boucles *Kringle* a été élucidé. Il semble que la boucle IV présente une activité d'auto-inhibition

moléculaire. Cependant, son récepteur n'est pas identifié et les mécanismes de régulation et le mode d'action de l'angiostatine ne sont pas encore élucidés. (O'Reilly *et al.*, 1996)

Les résultats de Folkman *et al.* (1996) sont en faveur d'une action inhibitrice de l'angiostatine sur le développement des métastases latentes. En effet, l'exérèse de la tumeur primaire de Lewis entraîne le développement de métastases en corrélation étroite avec une chute du taux urinaire en angiostatine.

L'administration d'angiostatine juste après l'exérèse inhibe le développement des métastases. Ces résultats indiquent que l'angiostatine joue un rôle dans le maintien de la latence des métastases.

- L'endostatine est un inhibiteur de l'angiogénèse identifié dans les cellules endothéliales hémangiomateuses. (O'Reilly *et al.*, 1997)

C'est une molécule de 20 kDa correspondant au fragment C-terminal du collagène type XVIII. Les souris déficientes en collagène XVIII présentent des anomalies vasculaires importantes avec, notamment, une absence totale de la formation de vaisseaux rétiniens rappelant le syndrome de Knobloch. L'endostatine inhibe fortement l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* ainsi que la croissance tumorale. Il a été proposé que son relargage continu *in vivo* fait régresser complètement la tumeur primaire vers l'état d'îlot microscopique latent. La validité de cette dernière observation n'est cependant pas acceptée d'une façon générale.

2.2.1.3.3) Autres

- Fragment hémopexine (PEX)

PEX est l'extrémité C-terminale de la métalloprotéinase MMP-2 et possède une forte activité anti-angiogénique et antitumorale *in vivo*. Ce fragment inhibe la fixation de la proMMP-2 à l'intégrine $\alpha\beta 3$ et à l'MT1-MMP et inhibe ainsi l'activité catalytique de MMP-2.

L'effet biologique du PEX semble donc résider dans une inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire et une inhibition de la migration cellulaire. Le PEX est une molécule très puissante dans l'inhibition du développement tumoral, notamment celui des glioblastomes. (Bello *et al.*, 2001)

- Facteur plaquettaire 4

Le facteur plaquettaire 4 (PF4) est un polypeptide de 7 kDa qui est produit dans les plaquettes sous forme de complexe tétramérique. Il inhibe l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*.

En effet, lors de l'activation, les plaquettes libèrent un inhibiteur de l'activité du FGF-2 identique au PF4.

Il a été proposé que le PF4 exerce son effet par inhibition de la liaison du FGF-2 et du VEGF à leurs récepteurs. Il empêche aussi l'activation des récepteurs aux FGF par inhibition de la liaison et de la dimérisation du récepteur. L'activité inhibitrice est due à une interaction directe entre PF4 et une molécule angiogène.

Des fragments du PF4 dérivés de la partie C-terminale présentant une activité inhibitrice très puissante dans l'inhibition du développement tumoral ont été également identifiés. (Bikfalvi, 2004)

- *Cornea-derived transcript 6* (CDT6)

Le CDT6, apparenté aux angiopoïétines, est un facteur qui a été identifié après hybridation différentielle dans le stroma de la cornée humaine. Des cellules de mélanome humain transfectées avec du CDT6 présentent une inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogenèse et une induction de la production de collagènes I et V. (Peek *et al.*, 2000)

- RECK

RECK (*REversion-including Cystein rich protein with Kazal motifs*) est une glycoprotéine de membrane qui inhibe les MMPs. Des souris RECK *-/-* meurent à 10,5 jours, en raison d'un développement vasculaire anormal. RECK inhibe MMP-2, MMP-9, et MMP-14.

RECK est surexprimé dans des cellules de fibrosarcome, et entraîne une réponse angiogénique et une croissance *in vivo* altérées. (Gabison *et al.*, 2003)

2.2.1.4) Acteurs du déclenchement de l'angiogenèse : le switch angiogénique

Chez les mammifères adultes, en conditions physiologiques normales, le réseau vasculaire est quiescent. L'angiogenèse est un processus finement contrôlé par une balance d'activateurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales.

Le terme de switch angiogénique fait référence au moment pour lequel il y a plus de facteurs pro-angiogéniques que de facteurs anti-angiogéniques, ce qui active des cellules quiescentes, qui vont initier l'angiogenèse. (figure 18)

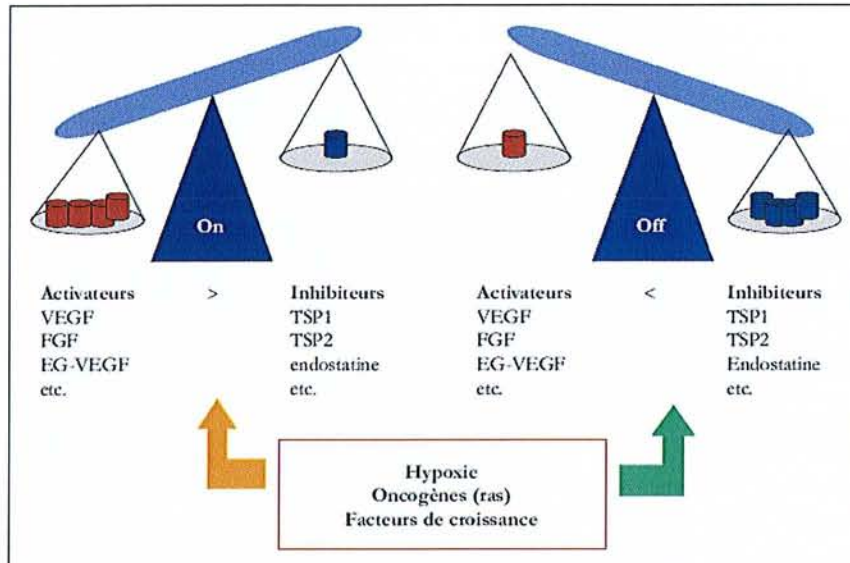


Figure 18 : Le switch angiogénique

L'hypoxie stimule l'expression des facteurs proangiogéniques (activateurs) et inhibe l'expression ou la production de facteurs anti-angiogéniques (inhibiteurs), grâce à la stabilisation d'HIF1 α , l'activation oncogénique ou certaines boucles autocrines ou paracrines de facteurs de croissance. Quand l'oxygène moléculaire augmente ou quand l'effet des oncogènes et des facteurs de croissance est inhibé, la production des inhibiteurs est supérieure à celle des activateurs. Cela entraîne un blocage de l'angiogenèse tumorale et une régression des néovaisseaux.

(D'après Bikfalvi, 2004)

❖ Rôle majeur de l'hypoxie dans le déclenchement de l'angiogenèse :

L'hypoxie est le stimulus majeur qui déclenche l'angiogenèse. (Harris, 2002)

Physiologiquement, l'hypoxie peut être le résultat d'une diminution de la pression partielle en oxygène de l'air, d'une augmentation de la consommation d'oxygène, ou du développement rapide d'un tissu (comme c'est le cas pour le corps jaune et le placenta).

En pathologie, la croissance tumorale conduit également à l'hypoxie.

Les cellules soumises à des conditions d'hypoxie vont alors lancer une réponse au stress, adaptée et coordonnée grâce à un facteur de transcription majeur : le HIF-1 α . Même si plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la réponse au stress hypoxique, tels que le NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) et l'AP-1 (*activating protein 1*), l'HIF est le plus puissant inducteur de l'expression des gènes de la glycolyse anaérobie, du VEGF, du Flt-1 et de l'EPO (érythropoïétine).

HIF est un facteur de transcription ubiquitaire composé de 2 sous-unités : HIF- α et HIF- β , qui s'hétérodimérisent. La sous-unité HIF- β est une protéine nucléaire constitutive alors que l'HIF- α est la sous-unité régulée par l'hypoxie et il en existe 3 isoformes 1 α , 2 α et 3 α . Les isoformes 1 et 2 sont contrôlés de façon similaire par des conditions hypoxiques par un mécanisme post-traductionnel. HIF-1 α et HIF-2 α forment des hétérodimères avec la sous-unité HIF- β .

HIF- α est la sous-unité en condition de stress hypoxique, qui induit la transcription de gènes contenant une séquence HRE (*hypoxia responsive element*) dans leur région promoteur. Parmi les gènes induits par l'hypoxie, impliqués dans l'angiogenèse on trouve le VEGF, le Flt-1, le Tie2, le TGF- β et l'EPO. (Park *et al.*, 2004)

L'hypoxie induit l'expression du VEGF-A et régule négativement l'expression de la TSP2 dans un grand nombre de cellules normales ou transformées. La nature précise de cette régulation a été récemment élucidée. Une enzyme appelé *prolyl-hydroxylase domain-containing enzyme* (PHD) lie l'oxygène moléculaire et le fixe sur des résidus spécifiques de proline du HIF1 α . Une autre protéine, appelée protéine de von Hippel-Lindau (VHL), lie ensuite le HIF1 α oxydé, et le complexe ainsi formé est ensuite ubiquitinylé et dégradé dans le protéasome.

Quand le taux d'oxygène baisse, ce processus est ralenti et le taux de HIF1 α augmente. A l'inverse, quand le taux d'oxygène augmente, la dégradation de HIF1 α est accélérée.

Il existe trois familles de PHD (PHD1, PHD2, PHD3) possédant des similarités de séquence. En dehors des sites d'hydroxylation de proline, des sites d'asparagine hydroxylée ont été identifiés. L'enzyme responsable de cette hydroxylation n'a pas encore été identifiée.

Une autre cible de l'hypoxie est également HIF2 α . La cible transcriptionnelle dans ce cas est le VEGFR-2 au niveau de la cellule endothéliale.

❖ Autres acteurs du switch angiogénique

Un modèle de souris transgénique RIP-Tag (souris présentant un insulinome), développé par Hanahan *et al.* en 1985, a permis de mieux comprendre les mécanismes d'induction de la néovascularisation tumorale et de fournir une base expérimentale pour le concept de switch angiogénique.

Les îlots pancréatiques de souris RIP-Tag, prélevés en phase préangiogénique et cultivés en présence de cellules endothéliales, n'entraînent pas de modifications de ces dernières quant à leur statut de différenciation, de migration ou de prolifération. En revanche, lorsque les îlots

sont prélevés à un stade de malignité déclarée et cocultivés avec les cellules endothéliales en gel de collagène en trois dimensions, la formation de réseaux capillaires convergents vers l'îlot est observée. Cela indique que les cellules tumorales acquièrent la capacité de stimuler l'angiogenèse au cours de leur progression maligne.

Différentes molécules semblent être à l'origine du switch angiogénique dans ce modèle. Néanmoins, la présence de VEGF-A est absolument requise. Ce facteur semble être essentiel et non redondant, car les souris présentant une inactivation conditionnelle de ce gène ne sont plus capables de développer une néovascularisation tumorale dans ce modèle. (Inoue *et al.*, 2002)

Par ailleurs, comme vu précédemment, Bergers *et al.* (1999) ont également montré que le VEGF est transloqué des cellules tumorales vers l'endothélium tumoral grâce à l'action d'une protéase, la métalloprotéinase MMP-9, et que cette translocation est un événement essentiel pour le switch angiogénique. La conversion du proMMP-9 en MMP-9 semble être le fait d'une autre protéase, la MMP-3.

L'activation oncogénique est également impliquée dans le switch, comme cela a été montré pour l'oncogène ras. L'insertion d'un oncogène c-ras activé dans des cellules MCF7 entraîne l'induction de l'expression du VEGF et la formation *in vivo* de tumeurs très vascularisées.

La perte d'hétérozygotie au niveau du locus codant pour p53 favorise clairement le switch, de même que le facteur de croissance/survie IGF11 (*insulin-like growth factor*) ; FGF-1 semble également impliqué. Le rôle de la protéine p53 a été élucidé dans différents modèles. Elle régule positivement l'activité d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme TSP1 et négativement le VEGF. A l'appui du rôle de p53, le groupe de Kerbel a récemment montré que des tumeurs HCT116 négatives pour p53 étaient moins sensibles, *in vivo*, à l'inhibition par des molécules anti-angiogéniques que les tumeurs HCT116 p53-positives. (Yu *et al.*, 2002)

A terme, l'objectif thérapeutique serait d'empêcher la survenue de switch angiogénique et ainsi de bloquer le développement tumoral à sa phase très précoce avant la survenue d'un risque de dissémination à distance. Un traitement anti-switch préventif pourrait ainsi être proposé aux patients à risques ou en situation adjuvante en cas de risque de récurrence.

Cependant, certaines études ont démontré qu'il existe d'autres moyens d'approvisionner la tumeur :

- Par le recrutement de précurseurs endothéliaux (vasculogenèse postnatale)

Il a été montré que des cellules précurseurs endothéliales circulantes, issues de la moelle, existent également chez l'adulte. Ces cellules sont recrutées au niveau des sites où la néovascularisation est intense, et peuvent être incorporées dans les néovaisseaux.

L'hypoxie et le VEGF sont les principaux médiateurs de ce recrutement. L'importance de ce phénomène dans la vascularisation tumorale dépend de la nature de la tumeur. (Asahara *et al.*, 1999)

- Par mimétisme vasculaire (« vascular mimicry »)

Il a été décrit, dans certains cancers très agressifs, que les vaisseaux intra-tumoraux pouvaient être constitués par des cellules tumorales dont le phénotype est de type endothélial. En effet, par un processus de transdifférenciation, les cellules cancéreuses miment les cellules endothéliales, jusqu'à former des vaisseaux fonctionnels. Les néovaisseaux ainsi formés sont constitués de ces cellules tumorales différenciées en endothéliales, en association ou non avec des cellules endothéliales normales. (Folberg *et al.*, 2000)

Beaucoup de questions restent encore sans réponse concernant le switch angiogénique, dont le mécanisme précis est encore largement méconnu. Quel est l'évènement qui va initier le switch ? Pourquoi certaines cellules restent-elles quiescentes alors que d'autres progressent ? Quelle est l'importance du switch angiogénique dans le processus de progression tumorale ? Ce mécanisme est-il unique, ou l'activation de la néoangiogenèse peut-elle intervenir par l'intermédiaire de différents processus ? Est-ce un phénomène irréversible ? Comment est-il régulé ?

2.2.1.5) Acteurs des interactions cellules/MEC

2.2.1.5.1) Les intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs d'adhérence, impliqués dans l'adhésion des cellules aux MEC, et dans les interactions cellule-cellule. Elles représentent une famille

de plus de 20 récepteurs transmembranaires différents constitués par l'association de sous-unités α et β . Actuellement, on a identifié environ 18 sous-unité α , et 8 β .

L'assemblage des sous-unités α et β forme un récepteur transmembranaire comportant un long domaine extracellulaire, une région transmembranaire, et un court domaine cytoplasmique. Le domaine extracellulaire peut se lier à différents ligands, tels que les protéines des MEC, comme la fibronectine, la vitronectine, le collagène, ou les récepteurs d'autres membranes cellulaires tels que ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule*) ou VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*). Le domaine cytoplasmique du récepteur interagit avec les protéines du cytosquelette.

Outre leurs propriétés de protéines d'adhérence, les intégrines ont un rôle important dans la transduction du signal, et interviennent dans la régulation de la réorganisation du cytosquelette, le transport intracellulaire des ions, le métabolisme des lipides, l'activation de certaines kinases et l'expression génique.

Les protéines-kinases interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la croissance et la différenciation cellulaire. Après fixation de ligands sur les intégrines, de nombreuses protéines cellulaires, telles que les protéines d'adhésion focale (protéines FAK par exemple), sont phosphorylées sur des molécules de tyrosine. (Varner & Cheresch, 1996)

L'intégrine $\alpha\beta3$ est une intégrine impliquée dans l'angiogenèse, et le remodelage vasculaire. Elle est ainsi exprimée essentiellement au niveau des néovaisseaux, et peu (ou pas) dans les vaisseaux quiescents. Elle est aussi présente au niveau des leucocytes, macrophages, ostéoclastes et dans certaines tumeurs malignes.

2.2.1.5.2) FAK

Le complexe d'adhérence est une large structure composée de protéines connectées entre elles par leur domaine SH2 ou SH3. (figure 19) Au sein de ces complexes, FAK est l'un des points centraux de ces connexions en étant l'intermédiaire entre les signaux activateurs des intégrines ou des facteurs de croissance et les autres protéines. Le nombre de protéines nécessite l'association de plusieurs protéines FAK pour permettre une bonne cohésion du système.

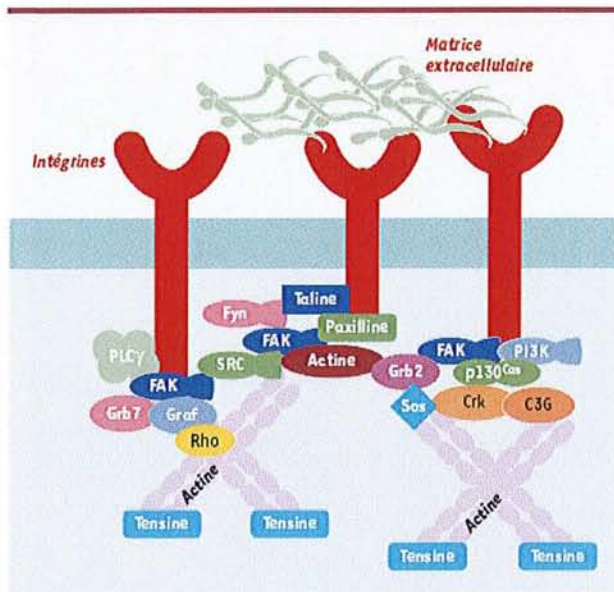


Figure 19 : Le complexe d'adhérence focale
(D'après Cornillon *et al.*, 2003)

FAK est une protéine d'un poids moléculaire de 125 kDa, de structure très conservée au sein des espèces. Son gène est localisé sur le chromosome 8. Elle ne possède ni région transmembranaire, ni région SH2 (*src homology 2*) ou SH3. Elle est divisée en 3 domaines (figure 20) ; un domaine amino-terminal et un domaine carboxy-terminal, délimitant un domaine central portant l'activité catalytique.

La région FAT (*focal adhesion targeting*), située dans le domaine C-terminal, est nécessaire pour la localisation de FAK dans le complexe d'adhérence par l'intermédiaire des liaisons avec la taline et la paxilline.

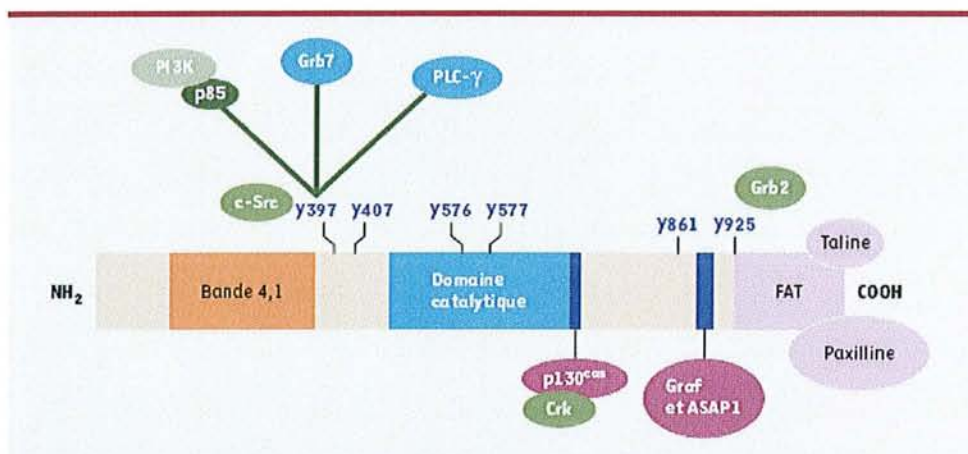


Figure 20 : Structure de FAK

La protéine FAK est divisée en trois domaines. L'autophosphorylation de la tyrosine en Y397 permet la liaison avec les kinases de la famille Src. Ces kinases vont phosphoryler les autres résidus tyrosine de FAK ainsi que des résidus de protéines liées à FAK. Dans la partie amino-terminale, on retrouve un domaine homologue avec les protéines du groupe bande 4.1/ERM (ezrine, radixine, moésine). Ce domaine permet l'association de FAK avec des récepteurs de facteurs de croissance. Sur la figure sont représentées les principales protéines interagissant avec FAK et leur site de liaison respectif.

(D'après Cornillon *et al.*, 2003)

ACTIVATION DE FAK

Les intégrines, des facteurs de croissance comme l'IGF, et des hormones peuvent activer FAK.

La protéine FAK activée va subir une phosphorylation en cascade de résidus tyrosine. C'est d'abord l'autophosphorylation du résidu tyrosine 397 qui est le témoin de son activation. Cette phosphorylation libère un site de liaison de forte affinité pour des protéines contenant un domaine SH2.

Les kinases de la famille Src, Fyn et c-Src, vont être recrutées et activées sur ce site. Elles vont phosphoryler d'autres résidus tyrosine dans le domaine catalytique, ainsi que dans la région C-terminale. Les phosphorylations des tyrosines Y576 et 577 par c-Src augmentent l'activité enzymatique de FAK, et permettent la création de nouveaux sites de liaison pour d'autres effecteurs.

L'activation de FAK et de c-Src est donc le point central du signal de transduction. (Mitra & Schlaepfer, 2006)

INTERACTIONS PROTEIQUES

Après son activation, FAK phosphorylée libère plusieurs sites de fixation pour des protéines contenant des domaines SH2. Ces sites vont permettre le recrutement successif des protéines du complexe.

Dans un second temps, les différentes protéines vont subir à leur tour une activation entraînant la mise en route de cascades de voies régulatrices intracellulaires importantes comme ERK/MAPK, PI3-kinase, et des réarrangements du cytosquelette.

Une nouvelle interaction entre FAK et STAT1 a été décrite récemment. B. Xie *et al.* (2001) ont montré que, parmi les différentes protéines STAT, STAT-1 pouvait être activée par FAK après l'adhérence à la matrice, et que cette activation influençait la migration cellulaire en limitant l'adhérence.

Le schéma simplifié de la figure 21 propose un résumé des possibilités d'interaction entre les protéines du complexe d'adhérence et les voies de signalisation sous-jacentes. FAK est initialement activée par l'intermédiaire d'intégrines et/ou de facteurs de croissance.

Cette activation va permettre la liaison et l'activation de plusieurs protéines.

Graf, Grb7, PLC- γ vont participer au remaniement du cytosquelette d'actine, engendrant ainsi un cycle de migration et d'adhérence cellulaires avec pour chaque étape une restructuration et une déstructuration des complexes d'adhérence.

p130Cas, Grb2, PI3-kinase vont secondairement participer à l'activation en cascade de plusieurs voies intracellulaires : la voie de ERK, la voie de JNK et la voie de la PI3-kinase. Elles vont permettre *in fine* de réguler plusieurs processus vitaux pour la cellule tels que la survie, la prolifération et la migration cellulaires en favorisant l'activation de facteurs de transcription.

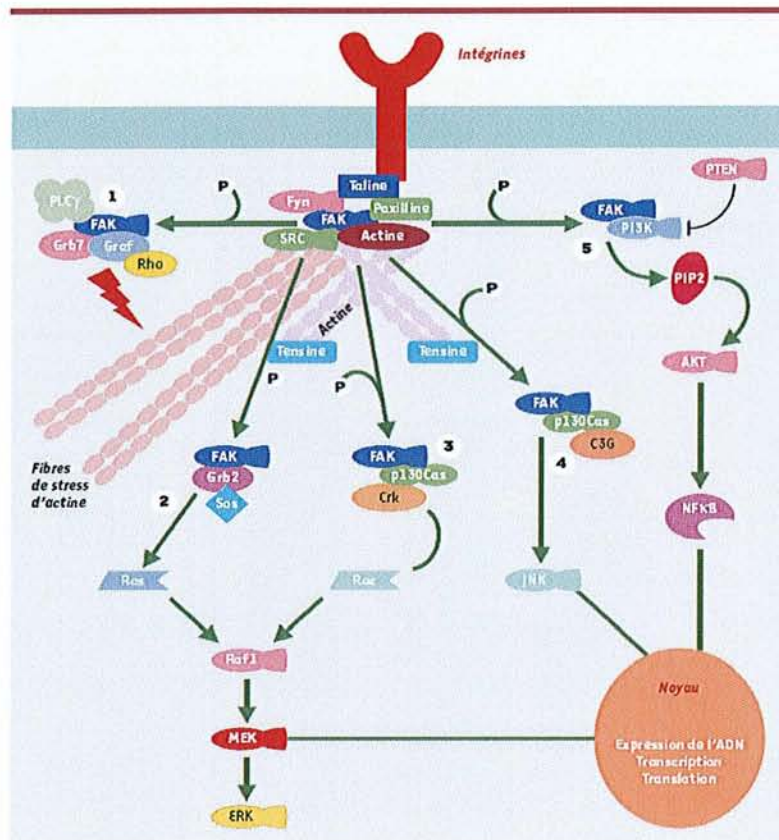


Figure 21 : Les voies de signalisation de l'adhérence focale

(D'après Cornillon *et al.*, 2003)

LES FONCTIONS DE FAK

- Migration cellulaire et FAK

Les cellules déficitaires en FAK, liées à la fibronectine, ont une forte diminution de leur capacité migratoire et cette capacité dépend de la phosphorylation des tyrosines 397, 576 et 577. Ces résultats sont bien démontrés pour des lignées fibroblastiques dérivées de cellules embryonnaires invalidées pour le gène FAK ; l'augmentation de l'expression de FRNK (*FAK-related non-kinase*) bloque la migration ; l'augmentation de l'expression de FAK augmente la migration; enfin, la mutation au niveau du site de liaison de FAK à la famille Src, Grb7,

PI3 kinase ou à Cas limite la migration. Si FAK est de nouveau exprimée correctement, on retrouve une migration normale.

La coopération entre adhérence et facteurs de croissance semble intervenir dans les processus d'angiogenèse au niveau des cellules endothéliales comme au niveau des cellules musculaires lisses. Dans les cellules endothéliales, il existe en effet une coopération étroite entre les intégrines et le VEGFR-2 passant par l'intermédiaire de FAK. Cette coopération est nécessaire pour une migration correcte de ces cellules. De même, dans les cellules musculaires lisses vasculaires, l'activation de FAK potentialise l'activation de ERK par le PDGF favorisant la prolifération et la migration.

Parallèlement à son action sur la migration cellulaire, de nombreuses études ont montré clairement la participation de FAK dans les processus du développement tumoral.

- Survie, prolifération cellulaire et apoptose

Les interactions entre les intégrines et la matrice extracellulaire participent aux processus vitaux cellulaires.

FAK, par ses interactions avec les intégrines est nécessaire pour la prolifération cellulaire. Zhao *et al.* (1998) ont montré à travers plusieurs études que la régulation de la prolifération se faisait par son intermédiaire. En activant les voies de ERK et de JNK, FAK permet d'accélérer le passage de la phase G1 à la phase S de la mitose, participant ainsi au cycle cellulaire.

La même équipe a montré que la voie de ERK, en réglant directement le promoteur de la cycline D1, une protéine nécessaire pour le déclenchement du cycle cellulaire, permettait une augmentation de son expression.

Dans un modèle de cellules épithéliales, il a été démontré que l'interaction entre l'adhérence cellulaire et le facteur de croissance MSP (*macrophage stimulating protein*) est nécessaire pour assurer correctement la survie des cellules par un effet de potentialisation entre les deux partenaires sur les signaux intracellulaires qui limitent l'*anoikis*.

En potentialisant la prolifération cellulaire et la survie, FAK est donc indirectement une protéine anti-apoptotique.

Ce rôle a été confirmé sur différentes lignées cellulaires.

- Cancérogenèse

Par son implication dans la migration et la survie cellulaires, FAK pourrait jouer un rôle dans le développement tumoral. Ainsi, l'expression de FAK est élevée dans des tumeurs du sein, du côlon, de la prostate, de la thyroïde, des ovaires ou du mésenchyme.

Plusieurs études suggèrent que FAK intervient dans les premiers événements conduisant au développement tumoral. Dans les cellules transformées surexprimant v-Src, FAK présente une phosphorylation trois à dix fois plus élevée et ne nécessite pas obligatoirement l'adhérence préalable à la matrice extracellulaire pour être activée.

Ces résultats suggèrent la possibilité d'une autonomisation des complexes d'adhérence dans certains modèles tumoraux occasionnant une hyperactivation et participant ainsi à la prolifération et à la migration cellulaires.

En raison de son rôle dans la migration cellulaire, il a été supposé que FAK pouvait participer à la formation des métastases. (Cornillon *et al.*, 2003)

Fak est donc au cœur d'un système régulateur impliquant l'adhérence à la MEC, mais aussi les facteurs de croissance, les hormones... Ce système est indispensable pour la migration, la prolifération et la survie cellulaire ; ce qui en fait une cible potentielle pour contrer l'angiogenèse.

2.2.2) Voies de signalisation intracellulaire

De nombreuses voies de signalisation oncogéniques convergent vers un nombre limité de facteurs nucléaires de transcription. Il pourrait sembler logique de chercher à inhiber les activateurs transcriptionnels ce qui permettrait de contrecarrer l'action des voies de signalisation dérégulées dans les cancers.

En réalité, ce sont les étapes qui conduisent à leur activation qui fournissent les points d'entrée.

Rappel : transduction du signal

Le récepteur membranaire est une protéine située à la surface cellulaire, pouvant reconnaître spécifiquement un ligand. En se fixant sur leurs récepteurs, certains types de ligands sont capables de déclencher une action dans la cellule, sans entrer eux-mêmes dans cette cellule.

Ces ligands transmettent ainsi un signal qui est traduit en langage intracellulaire : c'est la transduction.

La transduction s'effectue selon deux types de mécanisme possible :

- Transduction directe : le récepteur transduit lui-même le signal extracellulaire. C'est le cas des récepteurs-enzymes à « 1 passage membranaire ».
- Transduction où le récepteur est couplé à un effecteur : le récepteur assure les fonctions de reconnaissance du ligand ; un effecteur est responsable de l'action ; entre ces 2 protéines intervient une 3^{ème}, qui assure le couplage entre récepteur et effecteur. C'est le cas des récepteurs à « 7 passages membranaires ».

1) Transduction Directe

Les principales molécules impliquées dans la transduction directe, sont les protéines kinases, les protéines à domaine SH2/SH3, ainsi que les petites protéines G monomériques.

- Les protéines kinases

Les kinases qui phosphorylent des protéines situées dans la chaîne du signal formée depuis la membrane jusqu'au noyau, peuvent être, selon le résidu qu'elles phosphorylent, des Tyr-kinases (Tyrosine), ou des Ser/Thr kinases (Sérine/thréonine).

Les kinases situées sur la membrane sont des Tyr-kinases ayant un rôle de récepteurs de différents ligands. L'activité Tyr-kinase est stimulée lorsque le ligand se fixe sur le récepteur. D'autre part, la face interne de la membrane, et le cytosol, contiennent également de nombreuses kinases (Ser/Thr ou Tyr-kinase). Souvent une kinase existe dans le cytoplasme à l'état inactif, puis se trouve être activée par phosphorylation. Elle peut alors phosphoryler une autre kinase inactive, qui deviendra ainsi active, et phosphorylera alors à son tour une autre kinase inactive...

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK)

Les RTK sont des récepteurs possédant une activité enzymatique tyrosine kinase, c'est-à-dire de phosphorylation de résidus tyrosine.

L'effet des phosphorylations sur résidus tyrosine est double : modulation d'une activité enzymatique, mais aussi création de sites d'ancrage pour des domaines protéiques particuliers (domaines SH2, PTB (*phosphotyrosine binding*)), permettant le regroupement de plusieurs partenaires protéiques.

Les RTK sont regroupés en une vingtaine de familles d'après leurs homologies de structure. Certains récepteurs membranaires qui ne possèdent pas d'activité tyrosine kinase sont directement couplés à des tyrosine kinases cytoplasmiques et peuvent être rattachés aux RTK. Les RTK sont principalement impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, sous l'effet de facteurs de croissance.

Tous les RTK sont composés de trois domaines principaux :

- un domaine extracellulaire qui fixe le ligand ; ce domaine est composé d'un ensemble d'éléments conservés comme les domaines *Ig-like*, les régions riches en cystéine et les répétitions de fibronectine ; la composition en chacun de ces éléments varie selon les familles de RTK ;
- un domaine transmembranaire unique, constitué par une hélice α ;
- un domaine catalytique kinase, conservé entre les différents RTK, mais aussi proche du domaine de la sous-unité catalytique de la PKA (protéine kinase A) ; il possède un site de liaison à l'ATP (adénosine triphosphate), nécessaire à la phosphorylation, et un site de liaison du substrat ;

Les RTK contiennent également plusieurs résidus tyrosine, dont la phosphorylation entraîne l'activation du récepteur.

Dans certaines familles de RTK, le domaine régulateur constitue une boucle d'activation ou *kinase insert*, qui bloque l'accès au domaine catalytique.

Lors de la fixation du ligand, les RTK forment des dimères, ce qui permet la phosphorylation du domaine régulateur d'un récepteur par le domaine catalytique du récepteur associé. Plusieurs RTK sont également capables d'autophosphorylation.

La structure tertiaire des RTK peut être déduite des données du récepteur de l'insuline, dont la structure a été établie après cristallisation, en l'absence et en présence de ligand.

Transduction du signal des récepteurs tyrosine kinase

La phosphorylation des résidus tyrosine de la portion intracellulaire des RTK conduit à l'interaction avec des partenaires protéiques spécifiques. Ces partenaires contiennent des domaines protéiques particuliers appelés SH2 et PTB. Les RTK peuvent alors phosphoryler ces partenaires protéiques sur des résidus tyrosine, première étape de la transduction du signal.

Chaque RTK interagit avec une combinaison spécifique de partenaires, certains étant communs à plusieurs RTK, voire à plusieurs voies de signalisation, d'autres étant spécifiques

d'un récepteur. Parmi les partenaires communs, on retrouve la PLC (phospholipase C), la PI3K, le rasGAP (*ras GTPase activating protein*) et les tyrosine kinases de la famille Src. Parmi les partenaires spécifiques, on peut citer les *insulin receptor substrate* (IRS). Enfin, les partenaires peuvent avoir un rôle d'effecteur (comme la PLC) ou un rôle d'adaptateur (comme les IRS) dont la fonction est le rapprochement d'autres partenaires.

- Les protéines à domaine SH2/SH3

Les domaines SH2/SH3 ont été tout d'abord identifiés dans la protéine Src. Comme ils ont été retrouvés par la suite dans d'autres protéines, avec une assez bonne conservation, ils ont été appelés « src homology region 2 » et « 3 », d'où les termes SH2 et SH3. Les domaines SH2 et SH3, qui peuvent être situés n'importe où dans une chaîne peptidique, permettent l'interaction, l'emboîtement, de protéines différentes. Ils sont généralement dénués d'activité catalytique.

Domaines SH2 :

Il est constitué d'une centaine d'acides aminés, et contient le plus souvent 2 poches.

La première, toujours présente, qui reconnaît spécifiquement une Tyr, mais uniquement lorsque celle-ci est phosphorylée. La Tyr phosphorylée peut donc s'insérer dans cette poche, ce qui permet ainsi une interaction entre la protéine à Tyr phosphorylée, et la protéine à domaine SH2.

La deuxième, pas nécessairement présente, qui reconnaît le résidu situé en position +3 (ou +2) par rapport à la Tyr phosphorylée s'insérant dans la 1^{ère} poche. Ce résidu est responsable de la spécificité.

Les protéines à domaine SH2 sont par exemple, outre la protéine src, les protéines Grb2 (growth factor receptor bound 2), GAP (GTPase activating protein)...

Domaines SH3 :

Un domaine SH3 est constitué d'environ 60 acides aminés. Il reconnaît une région d'environ 10 acides aminés, riche en Pro (proline), située sur une autre protéine, ce qui permet donc également une interaction entre deux protéines.

(Etienne *et al.*, 2006)

2) Transduction où le récepteur est couplé à un effecteur

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) ont en commun l'existence de sept domaines transmembranaires, une portion N-terminale extracellulaire, une portion C-terminale intracellulaire, trois boucles intracellulaires et trois boucles extracellulaires. La plupart des RCPG possède une cystéine dans les boucles extracellulaires 1 et 2, formant un pont disulfure. La taille de ces protéines est très variable.

L'élément structural central ou *central core*, est constitué des sept domaines transmembranaires. Les RCPG sont classés en six familles principales ou classes de RCPG en fonction de leurs homologies de séquence.

Les récepteurs à sept domaines transmembranaires sont pour la plupart couplés aux protéines G, qui sont leurs effecteurs principaux. Les protéines G sont des hétérotrimères associant une sous-unité $G\alpha$, $G\beta$ et $G\gamma$. A l'état inactif, les trois sous-unités sont associées et la sous-unité $G\alpha$ lie un guanosine diphosphate (GDP).

L'activation du RCPG catalyse la libération du GDP, qui est alors rapidement remplacé par une molécule de guanosine triphosphate (GTP). Il y a alors une dissociation du complexe hétérotrimérique en deux parties : d'un côté le $G\alpha$ -GTP et de l'autre les sous-unités $G\beta$ et $G\gamma$ qui restent associées. Ces deux parties vont moduler l'activité de différents effecteurs : PLC, adényl cyclase, canaux ioniques... La fin du signal d'activation est marqué par la déphosphorylation du GTP en GDP : la sous-unité $G\alpha$ a une activité GTPase qui catalyse cette réaction. La sous-unité $G\alpha$ -GDP ainsi formée se réassocie alors aux deux autres sous-unités.

La plupart des sous-unités α des protéines G s'associent à des *regulators of G protein signal*, qui sont des cofacteurs de l'hydrolyse du GTP. Ces facteurs accélèrent environ 100 fois la dégradation du GTP et permettent l'inactivation précoce du signal. Certains effecteurs accélèrent également l'hydrolyse du GTP.

L'activation d'un RCPG permet l'activation de plusieurs protéines G : il y a amplification du signal. Cette amplification est variable d'un récepteur à l'autre.

Différentes sous-unités $G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$

La sous-unité α est constituée de deux domaines entre lesquels se trouve le site de liaison du GDP. Le domaine supérieur interagit avec la sous-unité β et également avec les RCPG. Les domaines β et γ sont imbriqués et indissociables, formant une seule sous-unité $G\beta\gamma$.

Environ 16 gènes codent pour des sous-unités α . Ces gènes peuvent être classés en quatre familles selon leurs homologies de séquence.

Les combinaisons entre différentes sous-unités au sein des hétérotrimères ne sont pas aléatoires : chaque type de sous-unités α s'associe exclusivement avec certains types de sous-unités $\beta\gamma$.

Cependant, en général, une protéine $G\alpha$ s'associe à plusieurs couples $G\beta\gamma$ différents.

L'expression de la plupart des sous-unités de protéine G est ubiquitaire.

Jusqu'à récemment, on pensait que l'essentiel de la transduction du signal des RCPG passait par les sous-unités $G\alpha$. Or, les sous-unités $G\beta\gamma$ ont également une action de modulation d'effecteurs, probablement aussi importante. Parmi ces effecteurs, on retrouve les cibles des sous-unités $G\alpha$ (AC, PLC, canaux Ca^{++} et K^+), mais aussi d'autres cibles comme la phospholipase A2, les MAP-kinases, la PI3K.

Chaque couple $G\beta\gamma$ active ou inhibe spécifiquement certains de ces effecteurs.

Transduction par l'intermédiaire des protéines G

Les protéines G sont les cibles principales des RCPG activés. Chaque RCPG active un ou plusieurs sous-types spécifiques de protéines G. Les mécanismes moléculaires de cette activation commencent à être élucidés. (Assié *et al.*, 2004)

3) Exemple de la protéine Src

Src est une protéine tyrosine kinase appartenant à une famille de neuf membres, les *Src family kinases*, dont certains sont ubiquitaires (Src, Fyn, Yes) et d'autres tissu-spécifiques (Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck, Lyn). La découverte de Src date de 90 ans : un virus est capable d'induire une tumeur solide, appelée sarcome de Rous. Le gène responsable, appelé v-Src, possède un homologue dans les cellules appelé c-Src.

c-Src est composé de cinq domaines : un domaine N-terminal, myristilé, permettant l'ancrage de Src à la membrane plasmique, un domaine SH3, un domaine SH2, un domaine tyrosine kinase et un domaine C terminal. Il existe par ailleurs deux résidus tyrosine importants : l'un en position 416, dans le domaine catalytique, dont la phosphorylation augmente l'activité enzymatique, l'autre dans le domaine C-terminal en position 527, dont la phosphorylation maintient la protéine en conformation inactive.

A l'état basal, Src est cytoplasmique. L'activation de Src passe par sa translocation à la membrane plasmique (myristylation), et par l'interaction avec les résidus phosphotyrosine de certains domaines protéiques de récepteurs membranaires ou d'adaptateurs.

Src se lie à ces protéines par le biais de son domaine SH2.

Les principaux récepteurs membranaires qui activent Src sont les RTK, les RCPG et les intégrines (lorsqu'elles sont liées à la matrice extracellulaire). La liaison de Src s'accompagne d'un changement de conformation, d'une déphosphorylation du résidu tyrosine 527 (par des phosphatases comme SHP-1 (*Src homology phosphatase-1*)) et d'une phosphorylation de la tyrosine 416, ces trois mécanismes conduisant à l'activation de la tyrosine kinase.

Au plan moléculaire, l'activation de c-Src est complexe : à l'état basal, le domaine SH2 se lie au résidu phosphotyrosine C-terminal 527 ; le domaine SH3 réalise également des interactions intramoléculaires, donnant à Src un aspect globulaire. L'activation de Src passe par la déphosphorylation de la tyrosine 527 : le domaine SH2 est alors libéré et peut s'ancrer sur les phosphotyrosines d'autres partenaires protéiques (des récepteurs membranaires ou des adaptateurs). De plus, le changement de conformation active le domaine tyrosine kinase ; la phosphorylation du résidu tyrosine 416 situé dans le domaine catalytique augmente encore l'activité enzymatique.

Les substrats de Src sont nombreux, principalement les protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire, la PI3K, Ras, les JAKs (janus kinases).

Src active ainsi plusieurs voies de signalisation ; la spécificité du signal est liée à la spécificité des interactions protéiques à la membrane plasmique.

Les effets principaux de Src sont la régulation de la croissance cellulaire et de l'adhésion cellulaire. (Assié *et al.*, 2004)

2.2.2.1) Voie de la PI3Kinase

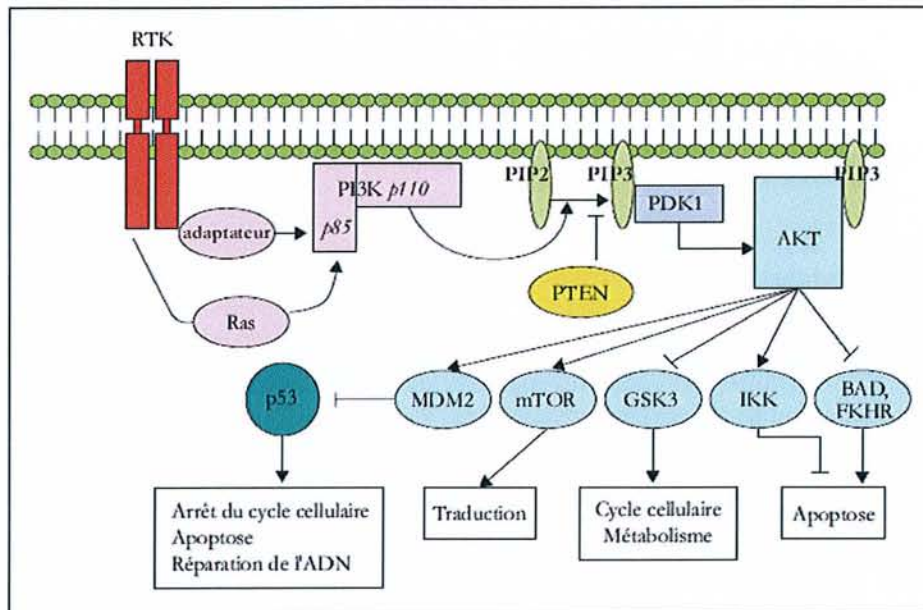


Figure 22 : La voie PI3K-AKT-mTOR

(D'après Cortot *et al.*, 2006)

La signalisation par la PI3K joue un rôle central dans la régulation de la croissance cellulaire, de l'entrée dans le cycle cellulaire, de la migration cellulaire et de la survie. (figure 22)

L'activation des récepteurs membranaires par divers facteurs de croissance entraîne la transmission d'un signal à travers le cytoplasme jusqu'au noyau où s'exerce une modulation signal-dépendante de l'activation de certains gènes.

Dans son passage intracytoplasmique, la transmission de ce signal passe par la phosphorylation de protéines kinases.

Parmi ces kinases, on individualise une famille de kinases de haut poids moléculaire à domaine catalytique proche, comprenant la PI3K et les kinases qui lui sont apparentées : les PIKKs (*phosphatidylinositol-3 kinase like-kinases*).

La PI3K peut interagir directement avec des récepteurs tyrosine kinase (PDGFR par exemple), indirectement *via* des adaptateurs (IGF1 receptor et IRS1 par exemple) ou encore par l'intermédiaire de Ras. Son activation entraîne une activation de la PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase*) qui, elle-même, provoque la phosphorylation d'AKT.

Cette activation d'AKT est responsable de l'activation de différentes protéines ayant un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la traduction.

2.2.2.1.1) PI3 kinases

La PI3K est une enzyme lipidique hétérodimérique composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice/adaptatrice. Il en existe huit formes chez l'homme, réparties en trois grandes classes (I, II et III) selon l'homologie de séquence et la préférence de substrat. Trois enzymes peuvent servir de sous-unité catalytique dans les PI3 kinases de classe I (sous-groupe Ia) : p110a, p110b et p110d.

Les deux premières sont des isoformes ubiquitaires, la dernière est particulièrement exprimée dans les leucocytes.

La sous-unité régulatrice/adaptatrice est représentée par l'enzyme p85d. L'association de ces deux sous-unités forme un complexe hétérodimérique. Les enzymes du sous-groupe Ia sont capables de se lier aux protéines phosphorylées en tyrosine ainsi qu'aux protéines comportant des séquences riches en proline.

Une des principales fonctions de la PI3K est de phosphoryler la partie D3 des phosphoinositols membranaires, ce qui aboutit à la formation de lipides tels que le PI3-phosphate (PI3P), le PI3,4-biphosphate (PI3,4P2) et le PI3,4,5-triphosphate (PI3,4,5P3). Ces lipides prennent part à de nombreux processus intracellulaires dont la prolifération cellulaire, la survie, la réorganisation du cytosquelette, le trafic membranaire, l'adhésion cellulaire, la mobilité cellulaire, l'angiogenèse et l'action de l'insuline.

PI3,4,5P3 est le principal lipide produit *in vivo*. Deux phosphatases différentes sont capables de le dégrader : les phosphatases à domaine SH2 et la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10). La perte de PTEN est une anomalie retrouvée dans plusieurs tumeurs solides (sein, mélanome, prostate, rein, ovaire, endomètre), soulignant le rôle de la voie PI3K dans la cancérogenèse.

2.2.2.1.2) PDK1

La PDK1 est une protéine acide à domaines kinase N-terminal et *pleckstrin-homology* (PH) C-terminal, ce dernier interagissant avec le PI(3,4,5)P3. Elle a une capacité de phosphorylation de la boucle T de multiples kinases. Certaines de ces kinases, dont AKT, nécessitent une interaction membranaire via les domaines PH. D'autres n'ont pas besoin d'interaction membranaire, comme la kinase ribosomale S6K.

2.2.2.1.3) Kinases AKT

Les kinases AKT (PKB) sont des Ser/Thr kinases. Il en existe trois types (AKT1, 2 et 3), chacun codé par un gène différent.

Elles possèdent un domaine PH en N-terminal.

Leur expression est variable selon les tissus.

Les domaines kinase des différentes isoformes ont une grande homologie (~ 85 %). Les effets oncogéniques des différentes formes d'AKT ne peuvent pas être distingués.

La protéine AKT intervient dans la survie cellulaire à plusieurs niveaux, notamment en activant mTOR (mammalian target of rapamycin), en inhibant la GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), ce qui provoque une augmentation des taux de β -caténine, ou en inhibant la protéine pro-apoptotique BAD.

2.2.2.1.4) mTOR

La mTOR, également appelée FRAP, RAF1 ou RAPT1, joue un rôle central dans la modulation des signaux prolifératifs, qu'ils soient physiologiques ou liés à une activation anormale de certaines voies. Il s'agit d'une phosphoprotéine kinase.

Elle appartient à la famille des PIKK. Le domaine kinase C-terminal présente une homologie avec les PI3 kinases. Cependant, il n'existe aucune activité kinase sur les lipides.

Sur le plan structural, mTOR se compose de trois grands domaines : le domaine FRB (*FKBP-RAP binding*), le domaine catalytique et le domaine HEAT. Le domaine FRB est le domaine de liaison à la rapamycine.

mTOR peut se trouver dans différents sites de la cellule : membrane cytoplasmique, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondrie et noyau.

Bien que tous les mécanismes de l'activation de mTOR par les signaux extracellulaires ne soient pas entièrement élucidés, la voie PI3K-AKT semble être la voie prépondérante.

Les perturbations de la voie PI3K-AKT-mTOR peuvent intervenir dans l'oncogenèse à plusieurs niveaux : autonomie par rapport aux facteurs de croissance, indifférence aux signaux antiprolifératifs, échappement à l'apoptose, néoangiogenèse et acquisition d'un potentiel invasif. Ces anomalies peuvent concerner différents acteurs de la voie et différentes tumeurs. Les anomalies de PI3K (amplification) sont en cause dans les cancers de l'ovaire chez l'humain et dans l'hémangiosarcome chez le poulet.

Les mutations de p110a ont été retrouvées dans des cancers bronchiques, coliques, gastriques, mammaires et cérébraux.

Les anomalies de AKT (amplification) sont en cause dans les cancers de l'ovaire, de la prostate et du sein chez l'humain et dans les lymphomes chez la souris.

2.2.2.2) Voie de la phospholipase C

La PLC génère l'IP3 et le diacylglycérol DAG à partir d'un phospholipide membranaire peu abondant, le phosphatidyl inositol 4,5-bisphosphate (PIP2). L'IP3 induit l'augmentation du calcium intracellulaire et le DAG active la PKC (protéine kinase C).

2.2.2.2.1) Phospholipase C

La PLC est une enzyme soluble, ancrée à la face cytosolique de la membrane plasmique. Deux types de domaines la composent : les domaines catalytiques (communs) et les domaines régulateurs, spécifiques, permettant de définir 11 isoformes de PLC.

2.2.2.2.2) Inositol triphosphate

L'IP3 augmente le calcium intracellulaire par deux mécanismes :

Le premier est l'ouverture de canaux calciques situés dans la membrane du réticulum endoplasmique, permettant la libération de calcium : ces canaux sont des homotétramères formés par l'association de quatre récepteurs de l'IP3. Les monomères possèdent en effet un site de liaison à l'IP3 dans leur partie N-terminale, six domaines transmembranaires dans la portion C-terminale et un domaine de régulation intermédiaire. Dans le domaine de régulation, on retrouve des sites de phosphorylation par la PKA (qui diminue l'ouverture du canal), la PKC, un site de liaison du calcium et un site de liaison de l'ATP (rôle régulateur).

Il existe pour ces récepteurs un rétrocontrôle positif : l'ouverture est favorisée par une petite augmentation du calcium intracellulaire. Cependant, une concentration élevée du calcium intracellulaire entraîne la fermeture de ces canaux.

L'autre mécanisme d'action d'IP3 est l'ouverture de canaux calciques spécifiques situés dans la membrane plasmique : ces canaux sont différents des canaux calciques connus jusqu'à présent et l'entrée de calcium associée est à distinguer de l'entrée de calcium associée à la dépolarisation des cellules excitables. Leur nature exacte n'est pas encore établie. Leur ouverture est déclenchée par la diminution des stocks de calcium dans le réticulum endoplasmique. Le couplage entre ces récepteurs et le réticulum endoplasmique n'est pas élucidé : des protéines appelées *transient receptor potential* (TRP) sont impliquées.

L'IP3, mais aussi le DAG semblent également impliqués.

L'inactivation de l'IP3 passe par deux mécanismes : la majeure partie est déphosphorylée par une phosphatase spécifique (cette phosphatase est la cible thérapeutique du lithium) ; une faible proportion est phosphorylée, transformée en inositol 1,3,4,5 tétraphosphate (IP4).

2.2.2.2.3) Diacylglycérol et Protéine Kinase C

Le DAG, formé par la PLC, fait partie de dérivés de lipides membranaires : sa concentration augmente lors de l'activation de la PLC. Le DAG reste localisé dans la membrane plasmique et active certaines isoformes de la PKC lorsqu'elles sont transloquées à la membrane plasmique. D'autres composés régulent l'activation des PKC : des composés dérivés de phospholipides membranaires (acide arachidonique, phosphatidyl sérine, acides gras libres), et des composés hydrosolubles comme le calcium ou certains dérivés du PI.

Douze isoformes de PKC sont connues, réparties en trois classes : les PKC classiques (α , β I, β II, γ) qui sont sensibles au DAG et au calcium, les PKC nouvelles (δ , ϵ , η , θ), activées par DAG seul, et des PKC atypiques qui ne sont activées ni par le DAG ni par le calcium. Il existe d'autres activateurs de la PKC, qui varient selon l'isoforme : les isoformes de PKC nouvelles et atypiques sont spécifiquement activées ou inhibées par certains acides gras particuliers, par l'acide arachidonique ; certaines sont activées par PIP3 (voie de la PI3-kinase).

Par le biais de ces activateurs spécifiques, chaque isoforme de PKC est la cible d'une (ou plusieurs) voie(s) de signalisation : les PKC classiques et nouvelles sont les cibles du DAG formé par l'activation de la PLC ; les PKC atypiques sont des cibles de voie de signalisation plus spécifiques.

Les domaines C1 et C2 des PKC sont les domaines régulateurs et possèdent des sites de liaison pour les différentes molécules régulatrices (DAG, acides gras libres, PIP3, phosphatidylsérine, calcium). Le domaine CaLB (*calcium lipid binding*) permet la fixation du calcium et participe à la translocation de la PKC à la membrane (par liaison à des phosphatidylsérines). Le domaine catalytique contient un site de liaison pour l'ATP et un site spécifique de liaison des ligands de l'enzyme.

Les PKC ont une activité sérine/thréonine kinase. La présence de phosphatidylsérine est indispensable à leur activation, ce qui explique probablement la translocation de l'enzyme nécessaire à l'activation. A l'état inactif, une partie du domaine C1, le pseudosubstrat, est lié au domaine catalytique. L'activation de la PKC passe par un changement conformationnel qui permet la coupure du pseudosubstrat par des protéases : le site catalytique est alors libéré.

La translocation des PKC à la membrane fait intervenir des partenaires protéiques appelés RACK (*receptors for activated C kinase*). Il en existe plusieurs isoformes, chacune étant spécifique d'isoformes particulières de la PKC. Ces adaptateurs sont régulés (taux cytoplasmique, phosphorylation). Ces adaptateurs sont aussi essentiels dans la spécificité de phosphorylation par les PKC : seuls des substrats spécifiques sont présentés à l'enzyme. Enfin, les RACK contribuent au *crossstalk* entre la PKC et d'autres voies de signalisation (par exemple, interaction avec Src, avec des phosphodiesterases, avec Ras-GAP).

Les cibles des PKC sont très variées et différentes selon l'isoforme considérée et selon le tissu. Par ailleurs, la majorité des substrats phosphorylés *in vitro* ne le sont pas *in vivo* : cette sélectivité s'explique probablement par des partenaires protéiques nécessaires à la colocalisation de la PKC et de son substrat. Les cibles de la PKC *in vivo* sont multiples : on peut citer la phosphorylation de récepteurs membranaires (RCPG, RTK), qui contribue à la désensibilisation de ces récepteurs, l'activation de la voie des MAPkinases impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'activation de la voie de signalisation NFκB. (Assié *et al.*, 2004)

2.2.2.3) Voie Ras/Raf/MAPK

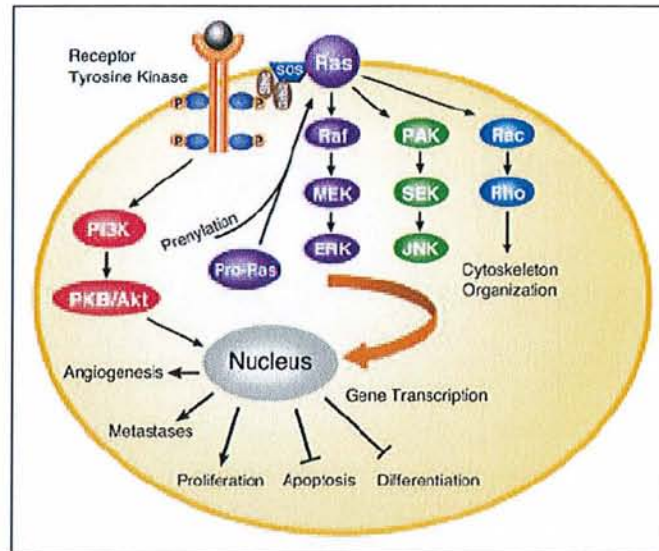


Figure 23 : Les voies de signalisation intracellulaire induites par l'oncoprotéine Ras

(D'après Beeram, 2005)

Les cellules reconnaissent et répondent aux signaux extracellulaires par la mise en jeu de programmes intracellulaires spécifiques tels que les cascades de signalisation qui conduisent à l'activation des MAPK. Le cycle des MAPK varie entre un état inactif non phosphorylé et un état actif phosphorylé sur un résidu thréonine et un résidu tyrosine.

Toutes les cellules eucaryotes possèdent de nombreuses voies MAPK dont la fonction est de coordonner la régulation de diverses activités cellulaires, telles que la division, la survie, la motilité, le métabolisme et la différenciation cellulaire, l'apoptose et l'expression génique. (figure 23)

A ce jour, cinq groupes distincts de MAPK ont été identifiés dans les cellules de mammifères :

- les ERK 1 et 2,
- les JNK 1, 2 et 3,
- les isoformes de p38 a, b, c et d,
- ERK 3 et 4,
- ERK 5.

La complexité du génome humain suggère de plus l'existence d'autres sous-familles de MAP kinase non encore caractérisées.

Les groupes de MAPK les plus étudiés, chez les vertébrés, sont ERK, JNK et p38 kinase.

Les MAPK sont activées par une grande variété de stimuli différents mais, de manière générale, ERK1 et ERK2 sont préférentiellement activées en réponse aux facteurs de croissance, alors que les JNK et P38 kinases le sont par les cytokines inflammatoires et des stimuli de stress, allant du choc osmotique à l'exposition aux radiations ionisantes.

Bien que chaque MAPK ait des caractéristiques uniques, l'ensemble des voies MAPK partage des propriétés communes.

Chaque voie MAPK est composée d'un ensemble de kinases, conservées au cours de l'évolution, qui agissent de manière séquentielle : les MAPKK kinases (MAPKKK), les MAPK kinases (MAPKK), les MAPK.

Les MAPKKK sont des Ser/Thr kinases qui sont le plus souvent activées par phosphorylation et/ou par interaction avec les GTPases des familles Ras ou Rho, en réponse à des signaux extracellulaires. Leur activation conduit à la phosphorylation et à l'activation des MAPKK qui, par la suite, stimulent l'activité MAPK à travers une double phosphorylation sur un résidu Thr et Tyr situé dans la boucle d'activation du domaine VIII de la kinase. Ainsi activées, les MAPK catalysent la phosphorylation d'une série de substrats sur des résidus sérine ou tyrosine. De plus, les protéines de la cascade des MAPK interagissent avec des protéines d'échafaudage, ce qui permet d'apporter un niveau supplémentaire de spécificité en organisant la voie de signalisation en modules définis dans le temps et l'espace.

Les MAP kinases exercent leur fonction par phosphorylation de divers substrats comprenant des phospholipases, des facteurs de transcription, et des protéines du cytosquelette.

Elles catalysent aussi la phosphorylation et l'activation de différentes protéines kinases appelées *MAPK activated protein kinase* (MK), qui représentent un échelon enzymatique supplémentaire dans l'amplification de la réponse cellulaire. (Hilger *et al.*, 2002)

Différentes familles de MAP kinases

2.2.2.3.1) Module ERK

Le module ERK1-2 est connu par sa fonction d'activation de la prolifération cellulaire. Il est constitué de A-Raf, B-Raf et Raf1 pour les MAPKKK, de MEK1 et MEK2 pour les MAPKK, de ERK1 et ERK2 pour les MAPK.

ERK1 et ERK2 partagent 83 % d'identité en acides aminés et sont exprimés dans la totalité des tissus. Ils sont très fortement activés par les facteurs de croissance, les esters de phorbol

et, dans une moindre mesure, par les RCPG, les cytokines, le stress osmotique et la désorganisation du cytosquelette microtubulaire.

De manière générale, les récepteurs membranaires tels que les RTK, comme le récepteur à l'EGF ou les RCPG, une fois activés, transmettent le signal d'activation vers différentes GTPases de la famille Ras.

L'activation de Ras se fait par l'intermédiaire de la protéine Sos qui est un facteur d'échange du nucléotide de Ras. Ainsi, la protéine Ras va échanger le GDP pour le GTP, modifiant ainsi sa conformation, et lui permettant d'interagir avec toute une série de protéines effectrices, incluant la kinase Raf.

Le mécanisme exact de l'activation de Raf n'est que partiellement connu, mais nécessite la liaison à Ras ainsi que de multiples phosphorylations qui surviennent au niveau de la membrane plasmique. Une fois activée, Raf se lie et phosphoryle les kinases MEK1 et MEK2 qui, par la suite, vont phosphoryler ERK1-2 sur le site thr-glu-tyr (TGY).

L'amplification du signal, qui résulte de cette cascade de signalisation, est telle que l'on peut estimer que l'activation de seulement 5 % des molécules RAS est suffisante pour induire la complète activation de ERK1-2.

Cette cascade enzymatique est structurée dans la cellule grâce à des protéines d'échafaudage qui permettent un contrôle spatiotemporel de cette voie de signalisation. La protéine échafaudage Ste5p, chez la levure, lie spécifiquement les MAPKKK, MAPKK et MAPK et, ainsi, permet leur couplage avec les activateurs. Chez les mammifères, aucun homologue de Ste5p n'a été identifié à ce jour, mais la protéine GIP1 semble avoir des fonctions similaires dans la cascade JNK chez les vertébrés.

Les protéines ERK1 et ERK2 sont localisées majoritairement dans le cytoplasme des cellules quiescentes mais, après stimulation, une population importante d'entre elles s'accumule dans le noyau. Activées, elles catalysent la phosphorylation de nombreux substrats dans tous les compartiments cellulaires aux niveaux nucléaire, membranaire et du cytosquelette. RSK, MSK et MNK sont les principaux substrats de ERK1 et ERK2. Il est intéressant de constater que les membres de la famille RSK sont exclusivement activés par les ERK, identifiant ainsi une cible spécifique de cette voie.

2.2.2.3.2) Module P38 MAPK

Le module P38 est composé de différentes MAPKKK comprenant les MEKK1-4, deux MAPKK MEK3 et MEK6, et les quatre isoformes de p38 a, b, c et d.

Dans les cellules de mammifères, les isoformes de p38 sont très fortement activées par les stress environnementaux et les cytokines inflammatoires.

La plupart des stimuli qui activent p38 activent aussi JNK. Cependant, seule P38 est activée dans le processus inflammatoire. MEK3 et MEK6 sont activées par de nombreuses MAPKKK, qui sont elles-mêmes activées en réponse à différents stress physiques ou chimiques tels que le stress oxydant, les radiations UV, l'hypoxie, l'ischémie, ou différentes cytokines, telles que l'interleukine 1 et des membres de la famille du TNF α . Il existe une certaine sélectivité entre MEK6 et MEK3 puisque MEK3 phosphoryle préférentiellement les formes a et b de p38.

La kinase p38 est présente essentiellement dans le cytoplasme des cellules quiescentes. Après stimulation, sa localisation cellulaire n'est pas clairement comprise ; certains travaux décrivent sa translocation du cytoplasme vers le noyau, d'autres indiquent que, activée, elle est aussi présente dans le cytoplasme.

L'activation de p38 est critique pour la réponse immune et inflammatoire. La protéine p38 est activée dans les macrophages, les neutrophiles et les cellules T, par de nombreux médiateurs extracellulaires de l'inflammation, tels que les cytokines et le lipopolysaccharide bactérien. Elle participe à la réponse fonctionnelle des macrophages et des neutrophiles, notamment le chimiotactisme, l'exocytose des granules, l'adhérence, le contrôle de la différenciation des cellules T et l'apoptose par régulation de la production de l'interféron γ .

2.2.2.3.3) Module JNK

Ce module est certainement le moins bien connu. JNK1, JNK2 et JNK3 (aussi connus sous les termes SAPKa, b et c) existent sous la forme d'au moins dix variants d'épissage et sont exprimés de manière ubiquitaire, bien que JNK3 soit présent préférentiellement dans le cerveau. Les JNK sont activés très fortement par la réponse aux cytokines, aux radiations UV, à des privations en facteurs de croissance, aux agents endommageant l'ADN et, de manière moins importante, par les récepteurs couplés aux protéines G. Comme celles d'ERK et de P38, l'activation de JNK nécessite une double phosphorylation sur tyrosine et thréonine sur le

motif très conservé TPY. Les MAPKK qui catalysent cette réaction sont connues sous le nom de MEK4 et MEK7. Elles sont elles-mêmes phosphorylées par différentes MAPKKK. Comme ERK et P38, JNK se localise au noyau après sa stimulation. Son substrat le plus connu est la protéine c-Jun.

Sa phosphorylation permet d'activer sa fonction de facteur de transcription. D'autres facteurs de transcription ont été décrits pour être phosphorylés par JNK tels que ATF2, HSF1 ou STAT3. Le fait que la stimulation de JNK ne permette pas sa localisation exclusive dans le noyau suggère que des cibles cytoplasmiques peuvent exister. Elles ne sont pas encore caractérisées. (Assié *et al.*, 2004)

2.2.2.4) Voie JAK/STAT

Les JAK sont des protéines tyrosine kinase cytoplasmiques qui contribuent à la transduction du signal de récepteurs membranaires, principalement de la famille des récepteurs des cytokines.

Certains RTK phosphorylent (et activent) la voie des JAK, conduisant à l'activation de STAT. Par ailleurs, certains adaptateurs des RTK comme Grb2 font partie des cibles des JAK.

Les principaux récepteurs sont les récepteurs des cytokines (ex : récepteurs des interférons) et apparentés (ex : récepteur de la GH (*growth hormone*), de la prolactine, de la leptine), et des récepteurs de facteurs de croissance. Chacun de ces récepteurs interagit avec une combinaison spécifique de JAK.

L'action globale de la voie des JAK est la croissance cellulaire et la prévention de l'apoptose.

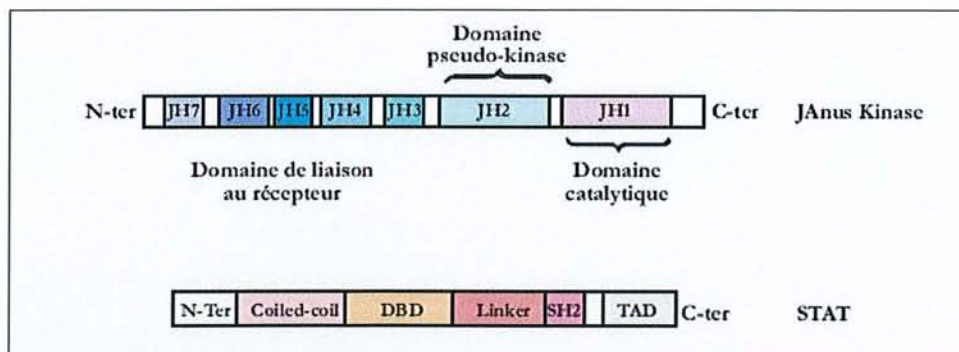


Figure 24 : Structure des JAK et des STAT

(D'après Espert *et al.*, 2005)

La famille des JAK se compose de quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Les JAK sont composés de sept domaines : un domaine catalytique tyrosine kinase JH1 (*JAK homology*), en C-terminal, un domaine JH2, homologue aux domaines catalytiques tyrosine kinase mais dépourvu d'activité enzymatique, qui semble jouer un rôle régulateur, et cinq domaines conservés JH3 à 7, jouant probablement un rôle dans les interactions avec les partenaires protéiques. Contrairement aux autres protéines tyrosine kinases, les JAK ne possèdent pas les domaines habituellement retrouvés (PH, SH2 et SH3). (figure 24)

Les JAK sont présentes à l'état inactif dans une cellule quiescente.

Leur activation passe par une translocation à la membrane : les JAK se lient à un récepteur membranaire dimérisé après fixation du ligand. Elles sont ainsi mises au contact de tyrosine kinases également transloquées à la membrane : des JAK (auto- ou transphosphorylation), des domaines tyrosine kinase de récepteurs de facteurs de croissance, des kinases de la famille Src. Les JAK phosphorylées actives participent à la phosphorylation des récepteurs dimériques sur lesquelles elles se sont ancrées. Les résidus phosphotyrosines ainsi formés sur les récepteurs servent de site d'ancrage à des protéines possédant des domaines SH2 et SH3 comme les STAT, les Src-kinases, des protéines phosphatases, des adaptateurs de type Grb2. Ces protéines sont phosphorylées par les JAK.

L'inactivation des JAK passe par le protéasome et l'action de protéines tyrosine phosphatases spécifiques comme SHP-1.

Les STAT sont les principaux effecteurs de la voie des JAK : il s'agit de facteurs de transcription présents à l'état inactif dans le cytosol, qui sont activés par phosphorylation sur résidu tyrosine après translocation à la membrane plasmique. L'activation conduit à une homo- ou hétérodimérisation des STAT, qui sont alors transloqués à la membrane.

Six gènes de STAT sont connus ; il existe par ailleurs des épissages alternatifs.

Les STAT sont des protéines d'environ 800 acides aminés, composés de cinq domaines : un domaine N-terminal très conservé et indispensable à l'activation, un domaine de liaison à l'ADN reconnaissant la séquence consensus TTNCNNNAA, un domaine SH3 putatif (certains résidus critiques des domaines SH3 sont cependant absents), un domaine SH2 permettant l'ancrage des STAT aux récepteurs membranaires et la dimérisation des STAT, un domaine C-terminal nécessaire à l'activation de la transcription. Il existe enfin un résidu tyrosine vers la position 700, cible des tyrosine kinases activatrices (JAK, mais aussi Src).

Parmi les mécanismes d'inactivation des STAT, il existe des inhibiteurs spécifiques appelés PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*), qui bloquent la capacité de liaison à l'ADN.

L'effet inhibiteur des PIAS semble être modulé par des modifications post-traductionnelles de leurs cibles. Par exemple, STAT1 peut être méthylée. Cette méthylation inhibe la capacité de PIAS1 d'interagir avec cette molécule, ce qui augmente la capacité de STAT1 à se lier l'ADN et à activer ses gènes cibles en réponse à l'IFN. (Raner & Reddy, 2002)

De plus en plus de publications soulignent le lien existant entre angiogenèse et voie JAK/STAT. Korpelainen *et al.* (1999) ont par exemple cherché à étudier l'activation des STATs par les trois récepteurs au VEGF (VEGFR-1, 2 et 3), et par Tie1 et Tie2. Il ressort essentiellement de cette étude que les trois VEGFRs (ainsi que Tie2 dans une moindre mesure) sont de puissants activateurs de STAT3 et 5.

STAT3 est le facteur de transcription le plus documenté pour le moment. De récentes études (Zhong & Zhong, 2007) qualifient son rôle de « pivot », dans l'angiogenèse. Il a en effet été montré qu'il pouvait induire l'expression du VEGF, mais également d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse : bFGF et les MMPs 2 et 9. De plus, en bloquant STAT3, on peut inhiber la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires, induites par le VEGF.

STAT3 agit donc à deux niveaux dans l'angiogenèse : régulation de l'expression de certains facteurs angiogéniques, et implication dans la réponse des cellules endothéliales aux signaux pro-angiogéniques. STAT3 constituerait ainsi une cible potentielle pour l'inhibition de l'angiogenèse.

2.2.2.5) Voie Wnt

Une des meilleures preuves de l'importance de la voie Wnt est sa conservation au cours de l'évolution. En effet, le gène Wnt présente 98 % d'homologie avec la séquence d'acides aminés correspondante chez la souris.

Beaucoup plus complexe qu'on ne le pensait il y a quelques années, la famille des gènes Wnt code à elle seule pour 19 molécules extracellulaires structurellement proches, qui sont des ligands pour la famille du récepteur membranaire Frizzled (Fzd) (comprenant elle-même déjà plus d'une douzaine de membres), un récepteur à sept domaines transmembranaires.

2.2.2.5.1) Voie wnt canonique :

La technique par microarray permet aujourd'hui de caractériser plus d'une centaine de gènes impliqués dans la transmission du signal véhiculé par les voies Wnt, dont voici les principaux, de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule :

- Dans la famille des ligands : les ligands Wnt, les protéines régulatrices WISP (Wnt-induced secreted protein), et des antagonistes de fixation de Wnt sur les Fzd comme les SFRP (Secreted Frizzled-related protein).
- Dans la famille des récepteurs, Fzd, et les corécepteurs LRP5/6 (*LDL related proteins*).
- Dans la famille des relayeurs intracellulaires :
 - le principal est la β -caténine, une protéine multifonctionnelle, capable aussi bien de réguler l'adhésion cellule-cellule, que d'induire une forte activation génique,
 - le régulateur Dsh (Dishevelled),
 - l'adaptateur axine qui est un régulateur négatif du signal,
 - le suppresseur de tumeur APC.
- Dans la famille des régulateurs post-traductionnels :
 - Des kinases telles que GSK3, ou les caséines kinases I et II
- Dans la famille des facteurs de transcription :
 - le complexe LEF-TCF (lymphoid enhancer factor-T-cell factor), qui est la principale cible (certaines des cibles directes de ce complexe sont Fos, Jun ou Myc, ce qui explique le grand nombre de gènes finalement ciblés par la voie Wnt)

La protéine caténine de type bêta est la molécule effectrice majeure de la voie de signalisation Wnt. La régulation de l'adhésion cellulaire s'effectue grâce aux capacités de fixation de cette protéine, à la fois au réseau d'actine (par l'intermédiaire de son association avec l' α -caténine), mais aussi aux jonctions adhérentes (par sa fixation aux cadhérines transmembranaires). (figure 25)

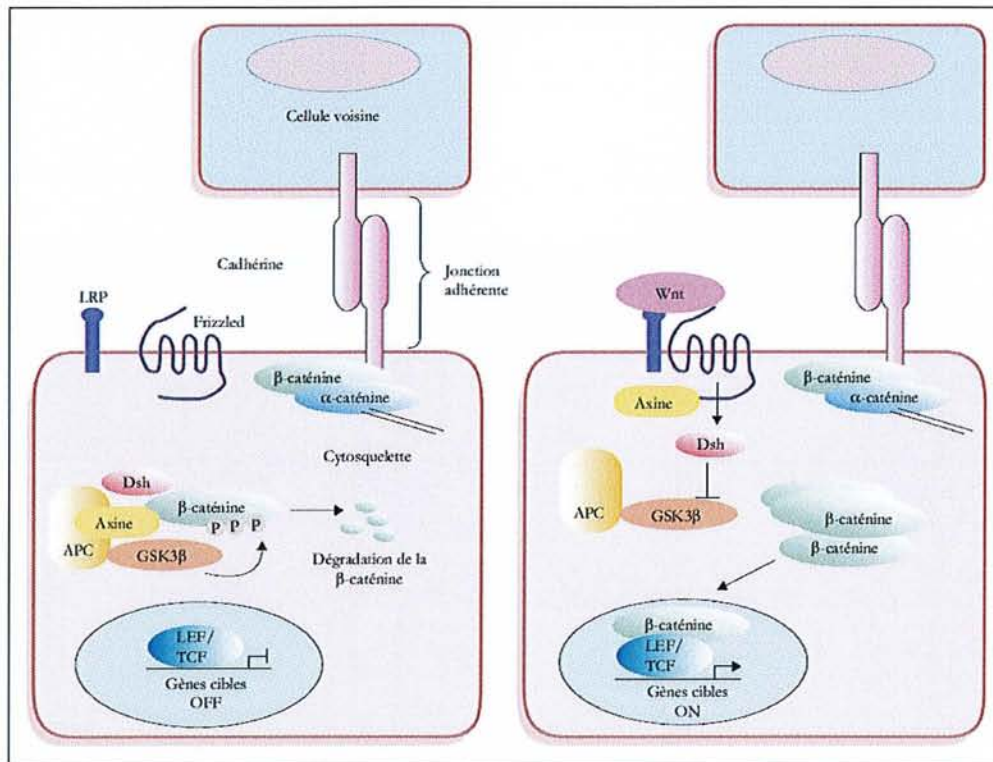


Figure 25 : Régulation de la β -caténine dans la voie Wnt

(D'après Reya & Clevers, 2005)

En l'absence de Wnt, la β -caténine cytosolique forme un complexe protéique avec l'axine et le suppresseur de tumeur APC (*adenomatous polyposis coli*) ; elle est ensuite rapidement dégradée par le système d'ubiquitination du protéasome.

Lorsque les cellules sont stimulées par les ligands Wnt, la β -caténine est libre de passer dans le noyau où elle forme des hétérodimères avec les facteurs de fixation à l'ADN de la famille LEF-TCF en venant exercer le rôle de coactivateur de la transcription génique. Des changements déterminants dans le programme d'expression génique vont en résulter.

La grande particularité de la β -caténine est qu'elle possède une seconde fonction bien différente, l'adhésion, qu'elle exerce *via* son interaction avec la E-cadhérine, le constituant principal des jonctions cellule-cellule. Elle relie ces jonctions au cytosquelette intracellulaire d'actine. Au total, les quantités de β -caténine qui effectuent ces deux fonctions sont en équilibre l'une par rapport à l'autre, et tout changement de l'une peut influencer sur l'action exercée par l'autre.

Par ailleurs, le signal Wnt peut être bloqué de façon extracellulaire par des facteurs sécrétés tels que WIF1 (*Wnt inhibitory factor-1*), des membres de la famille Dickkopf (Dkk) et des sFRP (*frizzled-related proteins*).

2.2.2.5.2) Voies Wnt non canoniques

A côté de la voie originelle de signalisation, il a aussi été montré que Wnt pouvait agir en induisant un signal différent de celui régulant les quantités de β -caténine. C'est le cas de la voie Wnt dépendant du Ca^{2+} qui passe par l'activation des protéines GTPases monomériques, telles Rho, Rac ou Cdc42, déjà connues pour réguler finement la motilité cellulaire.

Une autre voie Wnt utilise la protéine Dsh pour induire l'activation de la sérine-thréonine kinase JNK, une protéine sérine/thréonine kinase déjà impliquée dans bon nombre de voies de signalisation. Le blocage spécifique de cette activité va même inhiber sélectivement l'apoptose normalement induite, lorsque la voie Wnt est arrêtée. (L'Allemain, 2006))

La voie Wnt peut donc être activée par la voie canonique — selon différents mécanismes parmi lesquels on peut citer la répression d'antagonistes de Wnt tels que WIF1, la surexpression d'effecteurs de Wnt comme Dsh — ou par des voies non canoniques.

Plusieurs articles tendent à impliquer la voie Wnt dans l'angiogenèse.

Nestor *et al.* (2005) ont par exemple montré que l'expression de Wnt-1, ou d'une forme stabilisée de la β -caténine : la β -caténine S37A ; favorise la prolifération des cellules endothéliales, prolifération optimale en présence de bFGF. La voie de signalisation Wnt favorise également l'angiogenèse, en augmentant la production de facteurs pro-angiogéniques tels que l'IL-8.

Goodwin & D'Amore (2002) ont quant à eux montré que l'inhibition de la signalisation de la voie Wnt entraîne une stabilisation, voire une régression des vaisseaux sanguins.

2.2.2.6) La voie Delta/Notch

Le VEGF est fortement exprimé par les tissus en hypoxie, qui recrutent de nouveaux vaisseaux à partir des territoires environnants pour assurer leurs besoins en oxygène et nutriments. Plus la vascularisation des tissus, et donc leur oxygénation, se développe, plus l'expression du VEGF diminue. Cet élégant mécanisme de rétrocontrôle négatif est une clef de la régulation de la croissance des vaisseaux.

Toutefois, les vaisseaux exposés à de fortes concentrations de VEGF ne bourgeonneront pas tous. La réponse vasculaire au VEGF est affinée par d'autres mécanismes régulateurs. Plusieurs articles révèlent le rôle d'un autre partenaire, *Delta-like 4* (Dll4), un ligand de

Notch, dans la restriction de la réponse des vaisseaux au VEGF. Ce ligand Dll4 a suscité un intérêt particulier, puisqu'il est spécifique des artères et capillaires en bourgeonnement. La contribution de Dll4/Notch à l'angiogenèse embryonnaire et pathologique a ainsi été examinée.

Les divers modèles expérimentaux utilisés démontrent que l'absence de la signalisation Dll4/Notch, soit par ablation génétique, inhibition pharmacologique, ou administration d'anticorps antagonistes, provoque une angiogenèse excessive par bourgeonnement vasculaire.

Par exemple, S. Suchting (2007) montre que l'ablation d'un seul allèle *dll4* chez la souris accroît de façon spectaculaire le bourgeonnement et le branchement vasculaires au sein de la rétine. (figure 26)

La microscopie à haute résolution a permis d'observer un grand nombre de *tip cells* endothéliales un peu partout dans le plexus vasculaire des rétines *dll4*^{+/-}. (Les *tip cells* sont situées à l'extrémité des capillaires en bourgeonnement, ce sont des cellules dotées de nombreuses extensions filopodiales qui fonctionnent comme des senseurs de l'environnement et guident la croissance des vaisseaux.

Cette augmentation significative des *tip cells* chez les animaux *dll4*^{+/-} indique que, dans les conditions normales, leur formation est inhibée par une signalisation impliquant Dll4. En bloquant avec un inhibiteur pharmacologique spécifique la voie de signalisation Notch activée par la fixation de Dll4 à son récepteur, un phénotype similaire à celui du mutant *dll4*^{+/-} a pu être observé, ce qui montre que Notch est l'intermédiaire par lequel Dll4 agit dans ces vaisseaux.

Le VEGF est, comme nous l'avons vu précédemment, nécessaire au développement des vaisseaux dans la rétine. Le niveau d'expression du VEGF n'est pas modifié chez les animaux déficients en Dll4. Une possible altération de la présentation des récepteurs au VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-2 a donc été envisagée.

En effet, l'expression du VEGFR-2, qui relaie les effets pro-angiogéniques du VEGF, est augmentée chez les mutants *dll4*^{+/-}. En revanche, celle de VEGFR, régulateur négatif du VEGF, est réduite. L'absence de Dll4 semble donc entraîner une dérégulation de la balance d'expression des récepteurs au VEGF, avec pour effet ultime une réponse accrue au VEGF.

Le VEGF et les voies de signalisation Notch sont encore plus étroitement liés. En inhibant la signalisation du VEGF dans la rétine, une diminution de l'expression de *dll4* dans les *tip cells* a été observée. L'expression de Dll4 est donc dépendante de celle du VEGF qui agit, *in vivo*, en amont de Dll4. Le VEGF induit l'expression de Dll4, qui à son tour agit pour limiter la réponse du VEGF, se comportant comme un frein intrinsèque de l'angiogenèse.

Ces découvertes sur la boucle de régulation VEGF/Dll4-Notch ont donc un intérêt thérapeutique potentiel dans le traitement des angiogenèses pathologiques. Des anticorps bloquant la signalisation Dll4 ont ainsi été développés, indépendamment, par deux sociétés de biotechnologies américaines.

Dans des modèles de xéno greffes tumorales humaines chez la souris, l'administration d'anticorps anti-Dll4 provoque une augmentation spectaculaire de l'angiogenèse tumorale avec, de manière paradoxale en apparence, une réduction de la taille des tumeurs. Les nombreux nouveaux vaisseaux sont en fait hérissés de *tip cells*, et deviennent non fonctionnels, incapables d'assurer la circulation sanguine et la croissance tumorale qui en dépend. Il faut souligner que ce blocage de Dll4 s'est avéré efficace dans le traitement de tumeurs résistantes à des thérapies anti-VEGF.

Avec la mise au point d'anticorps humanisés anti-Dll4, les thérapies anti-angiogéniques pourraient donc prochainement s'enrichir d'un nouvel outil élargissant leur spectre d'application. (Suchting S *et al.*, 2007)

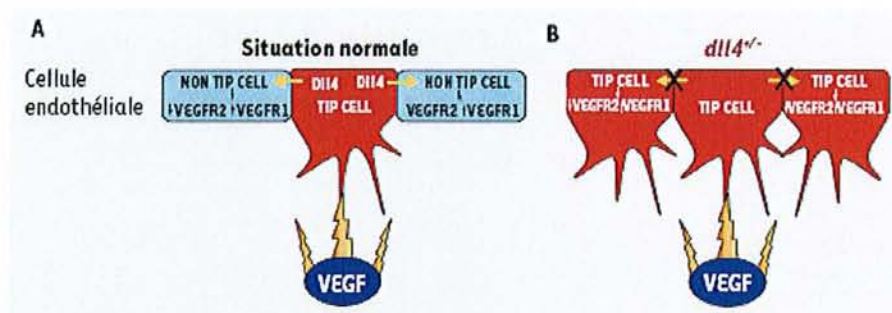


Figure 26 : Modèle proposé pour le mécanisme d'action de Dll4/Notch

En situation normale (A), le VEGF provoque l'acquisition par une cellule endothéliale (CE) d'un phénotype de *tip cell*, ce qui se traduit par l'émergence d'un bourgeonnement capillaire. Le VEGF induit également l'expression de *dll4*. En se liant à son récepteur Notch présent sur la CE adjacente, Dll4 inhibera la formation d'une autre *tip cell* en induisant une altération du taux d'expression des récepteurs au VEGF, rendant la cellule moins sensible au VEGF. Les vaisseaux *dll4*^{-/-} (B) sont incapables de transmettre le signal inhibiteur et le nombre de CE qui répondent de façon inapproprié au VEGF et deviennent des *tip cells* augmente. Il en résulte un branchement et une fusion excessifs de ces vaisseaux.

(D'après Suchting *et al.*, 2007)

Cette partie nous a donc montré la grande diversité des facteurs angiogéniques, ainsi que les nombreuses voies de transduction intracellulaires qui interviennent dans l'angiogenèse. Nous allons poursuivre en voyant de quelle manière ces données sont exploitées dans les stratégies anti-angiogéniques.

3^{ème} partie : Stratégies anti-angiogéniques

La stratégie anti-angiogénique a pour objectif de s'opposer au développement des néo-vaisseaux tumoraux, ou d'obtenir leur destruction sélective. Elle peut donc bloquer ou ralentir la croissance tumorale, maintenir les micro-métastases à l'état de dormance, et réduire la masse tumorale jusqu'à sa taille avasculaire.

En revanche, elle est peu susceptible à elle seule d'éradiquer les tumeurs ou d'induire leur régression, puisque celles-ci ne dépendent plus à ce stade de la vascularisation. D'où l'intérêt de coupler les agents anti-angiogéniques avec des chimiothérapies antitumorales, de façon à ce que la tumeur réduite puisse être éliminée.

Dans le cadre des tumeurs métastatiques, contrairement aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels, dont le but recherché est de détruire le plus grand nombre de cellules tumorales en un laps de temps assez court, les agents anti-angiogéniques seront utilisés de façon chronique à faible dose, de façon à induire une régression graduelle de la tumeur et à fournir une prévention à plus long terme de la dissémination métastatique.

3.1) Les thérapies moléculaires ciblées : généralités

3.1.1) Définition

Les limites des traitements cytotoxiques des cancers ont conduit de nombreuses équipes à travailler sur des approches alternatives du traitement des tumeurs. Du fait de l'intérêt du contrôle de l'angiogénèse dans le traitement du cancer, de nombreuses approches thérapeutiques visant les mécanismes biologiques qui permettent la vascularisation tumorale, ont été développées ces dix dernières années.

L'approche ciblée du traitement des tumeurs a été initiée par l'hormonothérapie dans les cancers du sein et de la prostate, confirmée par l'acide rétinoïque dans les leucémies aiguës promyélocytaires et par l'imatinib mésylate dans les leucémies myéloïdes chroniques.

Le concept de thérapie moléculaire ciblée fait référence à un type de médication qui bloque la croissance des cellules tumorales en interférant avec des cibles moléculaires indispensables pour la croissance tumorale ou la carcinogénèse.

On peut ainsi distinguer à titre d'exemples différents types d'agents thérapeutiques :

- de type monocible et monotypique : une seule cible moléculaire et un seul type cellulaire tels que bevacizumab et VEGF-A, erlotinib et HER1 (*human epithelial growth factor*), trastuzumab et HER2 ;
- de type multicible et homotypique : lapatinib et HER1 et HER2 ;
- de type multicible et hétérotypique : imatinib pouvant cibler les cellules tumorales ckit mutées et les cellules péricyaires par le récepteur du PDGF (PDGFR α), ou sunitib pouvant cibler également les cellules tumorales ckit mutées, les cellules endothéliales via les récepteurs du VEGF (VEGFR) et les cellules péricyaires via PDGFR α .

Le ciblage homotypique est une occurrence assez rare. Que ce soit par voie directe ou indirecte, le ciblage d'un seul récepteur a souvent un effet sur plusieurs populations cellulaires. Ainsi Izumi *et al.* montrent sur un modèle de xénotgreffe de cancer du sein que le trastuzumab a un effet anti-angiogénique indirect. Il normalise la vasculature tumorale et s'accompagne d'une augmentation locale des facteurs anti-angiogéniques (TSP1) et d'une diminution des facteurs proangiogéniques (VEGF et TGF α). (Izumi *et al.*, 2002)

Le ciblage de la néoangiogenèse tumorale offre des possibilités importantes.

Le phénotype angiogénique cancéreux est caractérisé par une forte densité tumorale de microvaisseaux et des taux élevés de VEGF. Lors de l'angiogenèse, comme vu précédemment, les cellules endothéliales sont stimulées par divers facteurs de croissance qui se lient à des RTKs. Les RTKs directement impliqués dans l'angiogenèse comprennent les récepteurs du VEGF, du FGF, du PDGF, de l'angiopoïétine, du HGF, de l'Eph et des récepteurs appartenant à la famille des récepteurs pour le facteur de croissance épithélial (EGF).

Plusieurs types de cibles peuvent être définis :

- Les interactions entre les cellules endothéliales et la MEC

La stratégie repose sur l'inhibition de la dégradation de la MEC, pour empêcher l'invasion et la migration des cellules endothéliales et bloquer ainsi l'angiogenèse. Elle est basée sur les inhibiteurs des MMPs, et les analogues de l'héparine, qui inhibent la fixation des facteurs angiogéniques bFGF.

Elle repose également sur l'inhibition des molécules d'adhésion et de jonction par des anticorps anti-intégrine $\alpha\beta3$, et des anticorps anti VE-cadhérine, inhibant ainsi les interactions requises dans la néovascularisation.

- La transmission intra-cellulaire du signal

Il s'agit de bloquer la transduction du signal, en ciblant les molécules qui interviennent tout au long de la cascade de signalisation. En effet, on peut supposer que toute molécule interagissant avec les voies de signalisation intracellulaires décrites dans la 2^{ème} partie de cette thèse, aura un impact sur l'angiogenèse. Cette stratégie est par conséquent potentiellement exploitable en thérapeutique. L'inhibition de la signalisation interviendra dans ce cas plus en aval qu'avec les stratégies thérapeutiques touchant les facteurs de croissance angiogéniques ou leurs récepteurs. Ces deux approches peuvent par conséquent être envisagées de manière complémentaire et permettre d'obtenir des réponses synergiques.

- La liaison des facteurs angiogéniques à leurs récepteurs, au niveau des cellules endothéliales

Nous avons, dans le cadre de notre première partie, étudié les différents acteurs de l'angiogenèse, leurs propriétés, et leur mécanisme d'action via leur récepteur.

La stratégie consiste ainsi à utiliser des inhibiteurs de facteurs de croissance, des antagonistes de leurs récepteurs, ou encore des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase. La stratégie anti-VEGF reste encore la plus étudiée, à en juger par le nombre de molécules contrant le VEGF en cours d'essai clinique.

En effet, ce dernier est un facteur clé de l'angiogenèse tumorale, et il est accessible directement par voie systémique.

Il est également surexprimé dans de nombreuses pathologies tumorales telles que : cancers colorectaux, du foie, du poumon, de la thyroïde, du sein, du rein, de la vessie, dans les angiosarcomes...

Afin d'inhiber la voie VEGF, on peut agir soit sur la molécule, soit sur ses récepteurs.

- Stratégie anti-VEGF via ses récepteurs :

Anticorps anti-VEGFR-2, molécules inhibant l'activité des récepteurs, ribozymes...

- Anti-VEGF

Aptamers, récepteurs solubles, anticorps bloquant...

- Les cellules endothéliales directement

3.1.2) Le concept de normalisation vasculaire

Ce n'est que depuis moins de 5 ans, sous l'impulsion des travaux du groupe de Rakesh Jain, que l'on s'intéresse à comprendre le paradoxe existant entre la destruction des néovaisseaux par des traitements anti-angiogéniques et l'amélioration de l'efficacité des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie. (Jain, 2005)

En effet, l'hypoxie qui devrait être créée par l'éradication des vaisseaux devrait produire l'effet inverse. D'où l'hypothèse que ces traitements pourraient produire une éradication des néovaisseaux, puis secondairement favoriser la reconstruction des contacts entre cellules luminales et murales des vaisseaux, les rendant ainsi moins matures, moins tortueux, moins dilatés et moins perméables, et que donc cette normalisation favoriserait une meilleure diffusion aux agents de chimiothérapie.

Les preuves expérimentales de la normalisation des vaisseaux tumoraux sont encore parcellaires. L'idée centrale de la recherche préclinique repose sur la mesure de la pression interstitielle et de la fraction hypoxique des tumeurs sous l'effet d'agents anti-VEGF.

Il semble qu'un traitement dirigé contre le VEGF ou le VEGFR-2 est rapidement suivi d'une réoxygénation de la tumeur la rendant plus sensible à la radiothérapie et à une diminution de la perméabilité, provoquant une diminution de la pression interstitielle, donc une meilleure diffusion des agents de chimiothérapie.

Pour le groupe de Jain, il s'établirait une fenêtre thérapeutique pendant laquelle la réoxygénation et la baisse de la pression interstitielle se maintiendraient grâce à une couverture accrue des cellules endothéliales par les péricytes par le biais de l'angiopoïétine et de la dégradation des matrices extracellulaires anormalement épaisses.

Une trop forte pression anti-angiogénique provoquerait une résistance au VEGFR-2 et une reprise de la réaction angiogénique. Il est peut-être difficile d'imaginer que dans les tumeurs humaines, l'extrême hétérogénéité de la vascularisation des tumeurs primaires et des métastases les rende aussi sensibles à l'établissement d'une fenêtre thérapeutique.

Le concept de normalisation vasculaire n'a pas encore été très documenté chez l'homme. La publication du groupe de Willett démontrait sur 6 patients atteints de cancer du colon métastatique traités par le bevacizumab une réduction de la pression interstitielle, du nombre de cellules endothéliales tumorales, des progéniteurs endothéliaux circulants, une augmentation de la couverture péricytaire des cellules endothéliales intratumorales. (Willett, 2007)

3.2) Stratégies en rapport avec les voies de transduction du signal

3.2.1) La voie de signalisation PI3K-AKT

3.2.1.1) Inhibiteurs non spécifiques de la voie PI3K

UCN01

UCN01 (7-hydroxy-staurosporine) est un dérivé de la staurosporine ayant la capacité d'inhiber PDK, ce qui entraîne la déphosphorylation et ainsi l'inactivation de AKT. Il a également une action inhibitrice des CDK. Des études de phases I et II sont en cours. Une étude de phase II n'a pas montré d'effet antitumoral dans le carcinome rénal à cellules claires. Les effets secondaires sont une hyperglycémie (avec risque d'acidose métabolique), une hypotension (avec risque de syncope), une hypoxémie, des céphalées et des troubles digestifs. L'administration se fait par voie intraveineuse. (Fuse *et al.*, 2005)

Pérfosine

La pérfosine est un alkyl-phospholipide synthétique capable d'inhiber AKT, mais aussi PKC, et la phospholipase C. Elle provoque également un arrêt du cycle cellulaire via l'induction de la voie P21-WAF1/CIP1. Son activité antitumorale a été étudiée et confirmée en phase préclinique. Des études de phases I et II sont en cours, notamment sur les glioblastomes et les sarcomes.

Ses principaux effets secondaires sont l'asthénie et les troubles digestifs (nausées, vomissements, diarrhées) qui peuvent nécessiter l'arrêt du traitement. Son administration se fait par voie orale. (Kondapaka *et al.*, 2003)

17AAG

Le 17-alkyl-déméthoxygeldanamycine (17AAG), un dérivé de la geldanamycine, est un inhibiteur de la heat shock protein 90 (Hsp90). La Hsp90 appartient à la famille des chaperons moléculaires qui participent à l'organisation et au bon repliement des protéines dans la cellule. Elle est particulièrement impliquée dans le repliement des récepteurs d'hormones stéroïdes et de kinases régulatrices du cycle cellulaire.

Le 17AAG entraîne une diminution d'expression d'AKT, de PDK1 et d'autres kinases participant à d'autres voies signalétiques. Des études de phases I et II sont en cours. Ses effets

secondaires sont des diarrhées et une élévation transitoire des transaminases. L'administration se fait par voie intraveineuse. (Banerji *et al.*, 2005)

3.2.1.2) Inhibiteurs de mTOR

Rapamycine

La rapamycine, ou sirolimus, est un antibiotique de la famille des macrolides identifié il y a plus de 20 ans. Elle est issue de *Streptomyces hygroscopicus*, un micro-organisme tellurique. Dépourvue d'efficacité antibactérienne, elle possède une activité antifongique, notamment contre *Candida albicans*. La découverte du tacrolimus (FK506), autre dérivé issu d'un *Streptomyces*, et son efficacité en tant qu'immunosuppresseur ont relancé l'intérêt porté à la rapamycine.

En raison de son action immunosuppressive, la rapamycine a reçu une autorisation de mise sur le marché pour la prévention du rejet d'organe pour les greffes rénales. Par ailleurs, elle diminue le risque de resténose coronaire après pose de stent et a reçu une AMM dans cette indication (stents dits « actifs », imprégnés de sirolimus).

La rapamycine se lie, via son groupe méthoxy, à un récepteur intracytoplasmique de la famille des immunophilines, appelé FKBP12 (FK506 binding protein). Ce complexe interagit avec mTOR et l'inhibe. La rapamycine inhibe également la prolifération des lymphocytes T induite par antigène ou par certaines cytokines.

En inhibant mTOR, la rapamycine provoque :

- une inhibition de la traduction par diminution de l'activation de P70S6K et de 4E-BP1, ce qui entraîne une diminution de la synthèse protéique globale d'environ 15 % et une diminution plus marquée des protéines à domaine 5'TOP et 5'UTR (protéines ribosomales, facteurs de croissance, c-myc, cycline D),
- un arrêt du cycle cellulaire en G1 par augmentation du *turnover* de la cycline D1, activation de p27 et diminution de la phosphorylation de Rb,
- un ralentissement de la croissance tumorale et de la néoangiogenèse,
- un ralentissement de la prolifération cellulaire, confirmé sur plusieurs types de tumeur,
- l'induction de l'apoptose dans certains modèles.

(Liu *et al.*, 2005)

La rapamycine est difficilement soluble dans l'eau et ne présente pas une bonne stabilité chimique, ce qui a poussé au développement d'analogues de la rapamycine possédant des

caractéristiques pharmacologiques plus adéquates. Les analogues de la rapamycine actuellement en développement sont le CCI779, le RAD001 et l'AP23573.

CCI779

Le CCI779 (*cell-cycle inhibitor 779*), ou temsirolimus (Wyeth), est un dérivé du sirolimus doté d'une meilleure solubilité dans l'eau, rendant son utilisation possible par voie intraveineuse. Les études précliniques ont démontré son activité antitumorale dans plusieurs lignées cellulaires issues de tumeurs humaines (prostate, sein, glioblastome, mélanome...). Il entraîne également une inhibition de la croissance tumorale dans les modèles de xénogreffes de tumeurs humaines, avec cependant peu de cas de régression tumorale.

Les études de phase I ont initialement étudié l'administration de CCI779 selon deux schémas différents : perfusion intraveineuse de 30 minutes de 0,75 à 19,1 mg/m² tous les jours pendant 5 jours, répétée toutes les 2 semaines, et perfusion intraveineuse de 30 minutes de 7,5 à 220 mg/m² toutes les semaines. La dose maximale tolérée dans le premier schéma était de 24 mg/m²/j (en l'absence de chimiothérapie antérieure), alors qu'elle n'a pas été atteinte dans le second schéma. La pharmacocinétique du CCI779 est dose-dépendante. Sa demi-vie est de 15,2 à 17,3 heures. Le sirolimus est son principal métabolite.

Ses principaux effets secondaires sont : toxicité cutanée (folliculite aseptique, rash maculopapulaire, xérodémie, lésions unguéales), toxicité hématologique (thrombopénie principalement), asthénie, anorexie, mucite, nausées, vomissements, diarrhées, hypercholestérolémie, hypertriglycéridémie, élévation des transaminases. Ils sont modérés et réversibles à l'arrêt du traitement. On ne note pas d'infection opportuniste.

Alors que les études précliniques montraient surtout un ralentissement de la croissance tumorale sous CCI779, des réponses majeures ont été décrites dans des cas de carcinome rénal à cellules claires, de cancer bronchique non à petites cellules, de sarcome des tissus mous et des réponses mineures ont été observées dans des cas de cancer du sein, de cancer de l'endomètre et de lymphome malin non hodgkinien.

Le fait que ces réponses soient obtenues à des doses non toxiques laisse supposer que la posologie optimale est inférieure à la dose maximale tolérée. (Raymond *et al.*, 2004)

RAD001

Le RAD001, 40-O-(2-hydroxyéthyl)-rapamycine ou évérolimus (Novartis Pharma AG) est un dérivé hydroxyéthyl éther de la rapamycine, disponible par voie orale. Il a montré une activité antiproliférative importante sur les lignées cellulaires issues de tumeurs humaines et sur les modèles de xéno greffe de tumeur humaine. Il possède également une activité anti-angiogénique.

Il est en cours d'étude dans des essais de phases I et II en tant qu'agent anticancéreux et est actuellement étudié en association avec la ciclosporine dans une étude de phase III dans la prévention du rejet de greffe rénale.

Les études de phase I ont permis d'évaluer sa demi-vie à 26-38 heures. La concentration plateau est atteinte à partir d'une posologie de 20 mg/semaine. Ses principaux effets secondaires sont l'anorexie, la fatigue, la mucite, les céphalées et la toxicité cutanée (rash).

Des stabilisations prolongées ont été obtenues, notamment chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, de fibrosarcome et de carcinome hépatocellulaire. (O'Donnell *et al.*, 2003)

AP23573

Le AP23573 (Ariad Pharmaceuticals), dernier-né des analogues de la rapamycine, a été synthétisé grâce à des programmes de modeling informatique. Il possède une grande affinité pour FKBP12 et mTOR. Il n'est pas une prodrogue de la rapamycine.

Cet agent a montré une action antiproliférative dans des modèles de lignées cellulaires issues de tumeurs humaines et de xéno greffes de tumeurs humaines.

Les études de phase I ont testé deux schémas d'administration : perfusion de 3 à 28 mg de 30 minutes tous les jours pendant 5 jours, répétée toutes les 2 semaines dans un cas, perfusion de 30 minutes de 6,25 à 25 mg, 1 fois par semaine dans l'autre cas.

Les effets secondaires sont : anémie, mucite, rash cutané, diarrhée, fatigue, anorexie, élévation des transaminases. Il n'y a pas toxicité dose-limitante. La demi-vie est évaluée entre 39 et 54 heures. L'inhibition de mTOR, évaluée par une diminution de plus de 80 % des taux de 4E-BP1 phosphorylé dans les cellules mononucléées sanguines, semble rapide et prolongée (supérieure à 10 jours).

Une réponse partielle a été observée chez un patient atteint d'un carcinome rénal à cellules claires. Des stabilisations ont été obtenues chez des patients atteints de sarcome et de cancer médullaire de la thyroïde. (Desai *et al.*, 2004)

3.2.2) La voie de signalisation Ras-Raf-MEK-ERK dans le traitement du cancer

3.2.2.1) Inhibiteurs de la farnésyltransférase

La protéine Ras a été la première cible identifiée pour inhiber la voie ERK sur la base de deux observations :

- les protéines Ras participent à la transmission des signaux de prolifération déclenchés par les récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase,
- le gène Ras est le siège de mutations activatrices fréquemment retrouvées dans de nombreuses tumeurs humaines.

Le fait que la farnésylation de Ras soit indispensable à son rôle oncogénique a logiquement conduit au développement d'inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTI), afin de cibler spécifiquement des tumeurs présentant des mutations activatrices de Ras. Ces dernières années, de nombreux inhibiteurs compétitifs, spécifiques de la farnésyltransférase, ont été conçus et peuvent être schématiquement répartis dans quatre classes :

- les analogues du farnésyl diphosphate (FPP) qui est le second substrat de la farnésyl transférase,
- les peptidomimétiques de la boîte CAAX,
- les inhibiteurs bisubstrats,
- les produits obtenus par criblage de produits naturels, tels que le R115777.

Leur capacité à inhiber la croissance des cellules tumorales *in vivo* est liée à leurs effets sur le cycle cellulaire, à leur capacité à induire l'apoptose et à leur effet inhibiteur de l'angiogénèse. Néanmoins, les mécanismes intimes qui sous-tendent ces effets restent partiellement élucidés. Leur développement préclinique a permis de montrer leur capacité à inhiber *in vivo* la croissance tumorale sur de nombreux modèles. De nombreuses études ont prouvé qu'elles sont capables d'inhiber la croissance de fibroblastes transformés par ras ainsi que des xénogreffes de tumeurs humaines.

Les FTI ont également été évaluées chez des souris transgéniques porteuses de H-ras, sous le contrôle du promoteur MMTV (*mouse mammary tumor virus*). Chez ces souris, qui développent spontanément des tumeurs mammaires et salivaires, le traitement par les FTI

induit une régression tumorale spectaculaire. Les deux principaux enseignements tirés de ces modèles animaux sont un effet cytotoxique parfois spectaculaire, alors que l'on attendait un effet cytostatique, et une très faible toxicité des traitements, laissant espérer un fort index thérapeutique.

Les FTI ont été initialement conçues pour cibler Ras. Effectivement, elles inhibent la transformation et la croissance tumorale dans les fibroblastes transformés par H-Ras. Cependant, de nombreux arguments expérimentaux suggèrent que Ras n'est pas la seule cible des effets cellulaires des FTI et que d'autres protéines farnésylées doivent être également impliquées dans leurs effets anti-transformants. D'autres cibles potentielles ont ainsi été étudiées. Les arguments les plus solides concernent les protéines RhoB et Rnd de la famille des Rho GTPases et impliquées dans la régulation du cytosquelette, les protéines Rheb de la superfamille Ras qui activent la croissance tumorale et les protéines PRL qui sont des protéines phosphatases impliquées dans la transformation et l'invasion tumorale.

En conclusion, il apparaît que l'effet biologique des FTI implique l'inhibition de multiples protéines farnésylées et que cet effet est variable en fonction du type de tumeur. L'élucidation de ces cibles demeure actuellement un défi crucial dans le développement des FTI.

La démonstration de l'efficacité des FTI dans des modèles précliniques *in vitro* et *in vivo* a abouti en moins de 5 ans au développement clinique (phases I-II) de quatre composés inhibiteurs non peptidomimétiques de la farnésyltransférase :

- le tipifarnib (R115777, Zarnestra®, Janssen),
- le lonafarnib (SCH66336, Sarasar®, Schering-Plough),
- le BMS214662 (Bristol Myers Squibb)
- et le L778/123 (Merck). Ce dernier a été retiré des études cliniques devant une toxicité cardiaque.

Parmi les trois autres molécules, le tipifarnib est à l'heure actuelle le plus étudié, que ce soit dans les tumeurs solides ou en hématologie.

On retiendra de ces essais une toxicité non négligeable.

L'analyse permet de mettre en évidence des réponses inconstantes, mais parfois inattendues, en particulier dans des tumeurs bronchiques ou pancréatiques lourdement prétraitées.

Les essais de phase II semblent montrer l'intérêt de ce type de molécules dans les cancers du sein et les glioblastomes. En revanche, ceux de phase III menés dans les cancers bronchiques à petites cellules et les cancers pancréatiques ont été très décevants.

De nombreuses observations précliniques plaident pour une utilisation des FTI en association avec d'autres traitements antitumoraux.

Par exemple, un effet synergique a été rapporté pour les associations des FTI avec les taxanes et les épothilones, probablement par leur action conjuguée sur les microtubules. Ces données ont été confirmées par un essai clinique étudiant l'association de SCH66336 (lonafarnib) et de paclitaxel.

Les FTI apparaissent également comme des agents radiosensibilisants très prometteurs, en particulier dans le traitement des gliomes mais aussi des tumeurs bronchiques et ORL.

Un effet synergique peut également être obtenu en associant les FTI à d'autres thérapeutiques ciblées. L'association d'inhibiteurs de CDK (*cyclin dependent kinase*) tels que la roscovitine, de la PI3K ou de HER2/Neu majore les effets pharmacologiques des FTI.

Enfin, il a été montré que l'association des FTI avec des traitements hormonaux était également prometteuse dans les cancers du sein hormonodépendants.

Bien qu'il puisse y avoir des niches thérapeutiques pour lesquelles les FTI soient particulièrement efficaces, le principal enseignement des études précliniques et cliniques est que l'inhibition de la farnésyltransférase n'est pas une bonne stratégie pour un blocage spécifique de la voie Ras-ERK. (Mazières *et al.*, 2004)

3.2.2.2) Inhibiteurs de RAF

La famille RAF comprend trois membres A-Raf, B-Raf et Raf1 qui partagent entre 78 et 80 % d'identité en acides aminés. Ils contrôlent le module ERK et sont le siège d'interactions avec de nombreuses molécules de la signalisation.

Le premier intérêt d'utiliser des inhibiteurs de Raf provient du fait que Raf est un effecteur important de Ras. Il est, en effet, raisonnable de penser que l'inhibition de cette kinase puisse

entraîner un effet antitumoral, dans des cellules qui expriment de manière anormale des récepteurs à tyrosine kinase, tels que la famille ERB, ou qui présentent des mutations de Ras. La découverte récente de mutations activatrices de B-Raf dans les tumeurs humaines a conforté l'intérêt de développer des inhibiteurs de la kinase Raf.

Parmi les gènes raf, seul *b-raf* est le siège de mutations activatrices, retrouvées avec une forte fréquence dans les mélanomes. En effet, près de 70 % des échantillons tumoraux de mélanomes présentent des mutations de raf. On peut retrouver ces mutations avec des fréquences significatives dans d'autres cancers tels que les cancers colorectaux, les cancers ovariens et les cancers d'origine thyroïdienne. Près de 90 % des mutations activatrices concernent le remplacement de la valine en position 599 par un résidu glutamate.

Cette mutation, qui se situe dans la boucle d'activation de la kinase, conduit à une activation constitutive de B-Raf. On suppose que l'activité de B-Raf est augmentée par cette mutation ponctuelle, parce que la charge négative amenée par le glutamate mime la phosphorylation qui se produit dans la boucle d'activation de RAF.

Des expériences de perte d'expression de B-Raf dans des cellules de mélanome, par une technique d'interférence à l'ARN, ont permis de confirmer que la fonction oncogénique de ce gène sur l'induction de la prolifération tumorale et la protection de l'apoptose dépendait de ERK.

Ces résultats ont conforté le développement d'inhibiteurs pharmacologiques de cette kinase et ont par ailleurs montré que seule la déprivation de B-Raf, mais pas celle de A-Raf ou de Raf1, dans des cellules de mélanome est à l'origine des effets observés.

Compte tenu de la grande homologie de séquences en acides aminés des trois protéines Raf, il n'est pas du tout sûr que l'inhibiteur actuellement développé, le BAY439006, soit spécifique de B-Raf. Ce manque de spécificité pourrait être à l'origine de résultats peu probants des études précliniques et cliniques actuellement en cours chez des patients atteints d'un mélanome ou d'un cancer du rein.

Ainsi, des efforts doivent être consentis pour le développement d'inhibiteurs spécifiques de la kinase B-Raf, permettant de mieux appréhender le rôle de Raf sur la voie des MAP kinases.

Le fait que Raf soit aussi impliqué dans une voie de survie, indépendante de MEK, laisse supposer pour l'inhibition de Raf un spectre d'activité anticancéreuse plus large que pour l'inhibition de MEK. Il sera nécessaire de valider cette cible avec des inhibiteurs plus spécifiques. (Beeram *et al.*, 2005)

Sorafenib, BAY 43-9006, (NEXAVAR®)

Le sorafenib est une petite molécule en administration orale développée initialement en tant qu'inhibiteur d'une sérine-thréonine kinase, Raf-1.

Elle a également une activité anti-tyrosine kinase étendue et cible VEGFR-2 et 3, cKIT, PDGFR α et FLT3. L'originalité de cette molécule réside donc dans son multiciblage « horizontal » (c'est-à-dire plusieurs récepteurs de facteurs de croissance pouvant appartenir à des types cellulaires différents) et « vertical » (c'est-à-dire plusieurs niveaux de transduction du signal, du récepteur à la cascade Ras-Raf-MAPK).

Nous reparlerons de cette molécule un peu plus loin dans cette thèse. (cf 3.3.1.2.2)

3.2.2.3) Inhibiteurs de MEK

Le rationnel pour utiliser les kinases MEK1 et 2 comme cible est similaire à celui pour utiliser Raf. En effet, ces enzymes ont un rôle central dans la voie ERK en transmettant des signaux de prolifération d'un large spectre de tumeurs humaines. De plus, l'expression *in vitro* d'une forme constitutivement active de MEK conduit à la transformation cellulaire donnant naissance à des cellules à très fort potentiel tumorigène.

Les protéines MEK sont des kinases à double spécificité qui contiennent deux sites kinase, l'un impliqué dans la phosphorylation d'un résidu sérine ou thréonine, l'autre dans la phosphorylation d'un résidu tyrosine.

Les kinases MEK1 et MEK2 sont exprimées de manière ubiquiste chez les mammifères et elles catalysent la phosphorylation aussi bien de ERK1 que de ERK2, sur la thréonine 185 et la tyrosine 183. Leur fort degré d'homologie suppose que les inhibiteurs de MEK développés auront pour conséquence le ciblage des deux protéines homologues MEK1 et MEK2.

Le premier inhibiteur de MEK à avoir été développé en phase clinique précoce est le CI1040. Cependant, les résultats encourageants de son efficacité antitumorale dans les essais de phase I n'ont pas été confirmés dans l'étude de phase II, ce qui a eu pour conséquence d'arrêter son développement. La preuve de l'inactivation de ERK a été faite sur des biopsies de patients, montrant simplement une réduction de 50 % de sa phosphorylation. Cela indique

d'une part qu'il est possible de caractériser *in vivo* l'effet pharmacologique de ces inhibiteurs et, d'autre part qu'il doit être possible d'augmenter l'efficacité de ces molécules.

Deux autres inhibiteurs plus spécifiques sont actuellement en cours de développement, le PD0325901 et l'ARRY142886.

De manière originale, ce sont des inhibiteurs non compétitifs de l'ATP vis-à-vis de son site de liaison. Leur capacité à inhiber les kinases MEK1 et 2 serait liée au changement de conformation de la protéine, occasionné par la liaison de l'inhibiteur sur un site différent de la poche de liaison de l'ATP. Ce mécanisme pourrait expliquer la remarquable sélectivité de ces molécules, d'autant plus que ce site est une région de la protéine qui n'a pas d'homologie de séquence avec les autres kinases. (Wallace *et al.*, 2005)

3.2.3) La voie JAK/STAT

Pour l'instant, la recherche d'inhibiteurs de cette voie de signalisation en est à ses premiers balbutiements.

De nombreux travaux ont démontré l'implication de l'activation de la voie JAK/STAT dans la tumorigenèse. À ce jour, sept membres de cette famille ont été identifiés et sont activés en réponse à la fixation de plusieurs dizaines de ligands à leur récepteur spécifique. Compte tenu du fait que l'activation de certaines STAT, en particulier STAT1, STAT3 et STAT5, est souvent dérégulée dans un grand nombre de tumeurs, il est capital de découvrir comment cette activation est maintenue ou réprimée et de connaître son rôle dans la transformation cellulaire.

Nous avons vu que plusieurs familles de protéines ainsi que plusieurs membres au sein d'une même famille, participent à l'extinction du signal après stimulation par les cytokines en ciblant diverses étapes de l'activation de la voie JAK/STAT. Cependant, la cellule cancéreuse parvient à échapper à ces contrôles négatifs en altérant ou en dérégulant une ou plusieurs de ces voies.

Ainsi l'expression ou l'activité de protéines à activité phosphotyrosine phosphatase, comme SHP1, ou des protéines SOCS comme SOCS1 peuvent être inhibées et favoriser ainsi l'action de facteurs de croissance et la croissance de la cellule tumorale dans certains cancers.

L'étude des voies de régulation négative de cette signalisation ouvre donc de nouvelles perspectives dans la recherche de stratégies thérapeutiques. L'identification de molécules qui imitent l'action des protéines inhibitrices de la voie JAK/STAT devrait ouvrir de nouvelles perspectives dans le domaine des thérapies anticancéreuses. (Espert *et al.*, 2005)

3.2.4) La voie Wnt

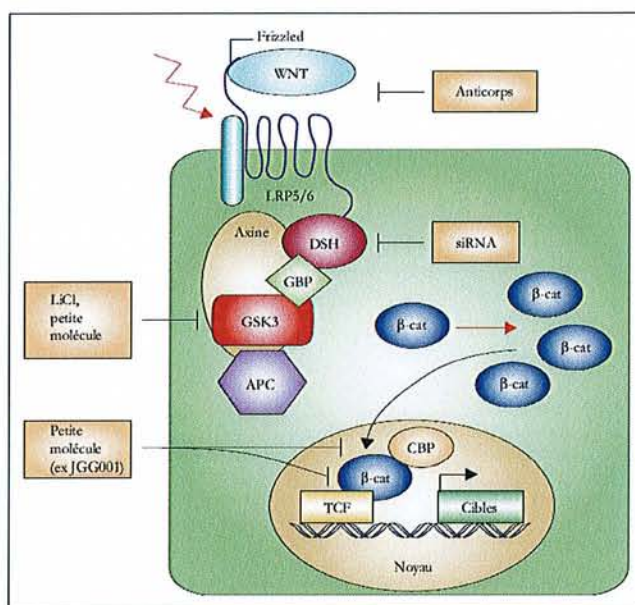


Figure 27 : Sites d'action envisageables sur la voie Wnt

(D'après Reya & Clevers, 2005)

Innovations thérapeutiques sur la voie WNT

L'approche de base est d'identifier les cibles transcriptionnelles de la signalisation Wnt/ β -caténine afin d'isoler, si elles existent, la ou les cibles spécifiques de la transformation oncogénique. A partir de multiples travaux réalisés sur des lignées cancéreuses ou sur des tumeurs plusieurs gènes candidats ont été ciblés.

Une bonne stratégie thérapeutique doit donc rechercher ces gènes à la fois parmi les activateurs de la voie Wnt mais aussi parmi les inhibiteurs puisque la dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine semble impliquée dans la progression du cancer et non seulement dans son induction.

Ainsi, ont été testées des petites molécules inhibitrices de l'interaction de la β -caténine avec les facteurs transcriptionnels TCF ou CBP (CREB-binding protein). (Emami *et al.*, 2004)

D'autres principes d'action ont été envisagés comme des anticorps thérapeutiques contre les Wnt ou comme la nouvelle et très prometteuse approche des siRNA. (figure 27)

A côté, plusieurs agents très éloignés de la voie de signalisation montrent des effets inhibiteurs : c'est le cas de certains anti-inflammatoires non stéroïdiens de type aspirine ou sulindac, ou de l'inhibiteur de tyrosine kinase STI571 (Glivec®) qui peut faire reconsidérer le rôle de Wnt dans les tumeurs sensibles au Glivec®. (Zhou *et al.*, 2003)

3.3) Autres stratégies de thérapie ciblée

3.3.1) Inhibition de la liaison des facteurs angiogéniques à leurs récepteurs

Parmi les cibles angiogènes de prédilection dans le traitement antitumoral, la famille du VEGF prédomine, car la plupart des tumeurs, si ce n'est toutes, expriment des niveaux élevés de VEGF (Cao, 2004). Différentes stratégies concernant cet acteur de l'angiogenèse sont exploitées. (figure 28)

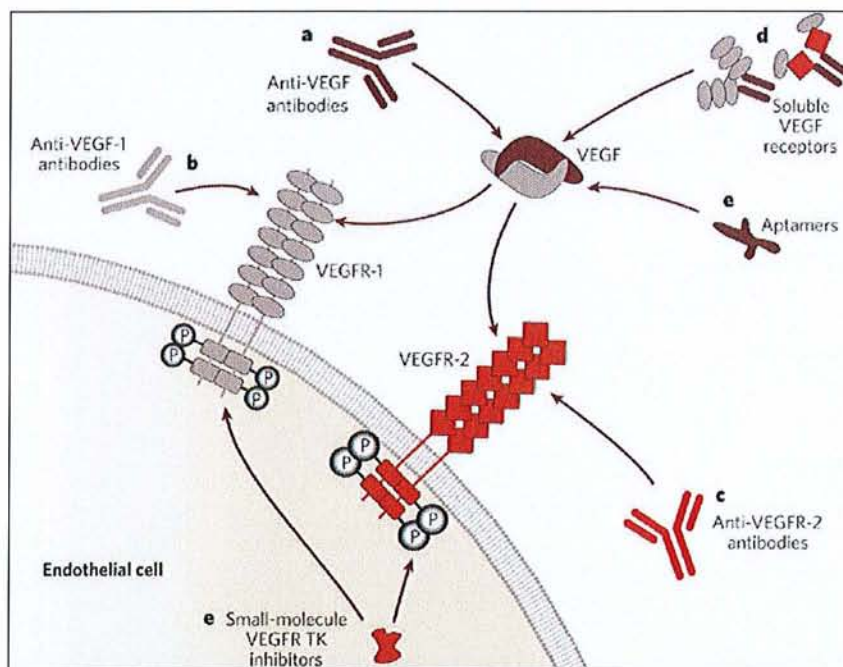


Figure 28 : Différentes stratégies d'inhibition de la signalisation induite par le VEGF

(D'après Ferrara & Kerbel, 2005)

3.3.1.1) Anti-VEGF

3.3.1.1.1) Les aptamers

Ce sont des molécules d'ARN synthétiques qui agissent en se liant à la molécule de VEGF, inhibant sa fixation au récepteur VEGFR-2. Cette stratégie n'a pas encore été testée sur des modèles tumoraux mais dans le traitement de rétinopathie. Ces « aptamers » se lient exclusivement sur l'isoforme VEGF125. (Lee *et al.*, 2005)

3.3.1.1.2) Le VEGF-trap

Il s'agit d'un anticorps soluble, formé par fusion de portion du VEGFR, et du domaine Fc de l'immunoglobuline humaine, ciblant le VEGF-A. Il joue un rôle d'antagoniste spécifique et son affinité pour VEGF est supérieure à celle des anticorps monoclonaux. (Thurston *et al.*, 2004). Une étude de phase II est en cours aux États-Unis dans le cancer du rein métastatique.

3.3.1.1.3) Les anticorps monoclonaux

Bevacizumab, (AVASTIN®)

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal partiellement humanisé (93 % humain-7 % murin). Il inaugure une nouvelle classe thérapeutique, celle des inhibiteurs du VEGF. Cette classe agit directement sur la vascularisation tumorale, et non sur les cellules tumorales. L'AMM en France, a été obtenue en avril 2005, en traitement de première ligne, chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique, en association à une chimiothérapie intraveineuse 5-fluorouracile/acide folinique avec ou sans irinotécan.

C'est le 1^{er} anti-VEGF commercialisé.

Il se lie au facteur pro-angiogénique VEGF, l'empêchant ainsi de se fixer à ses récepteurs VEGF-R, et donc d'exercer son activité biologique. (figure 29)

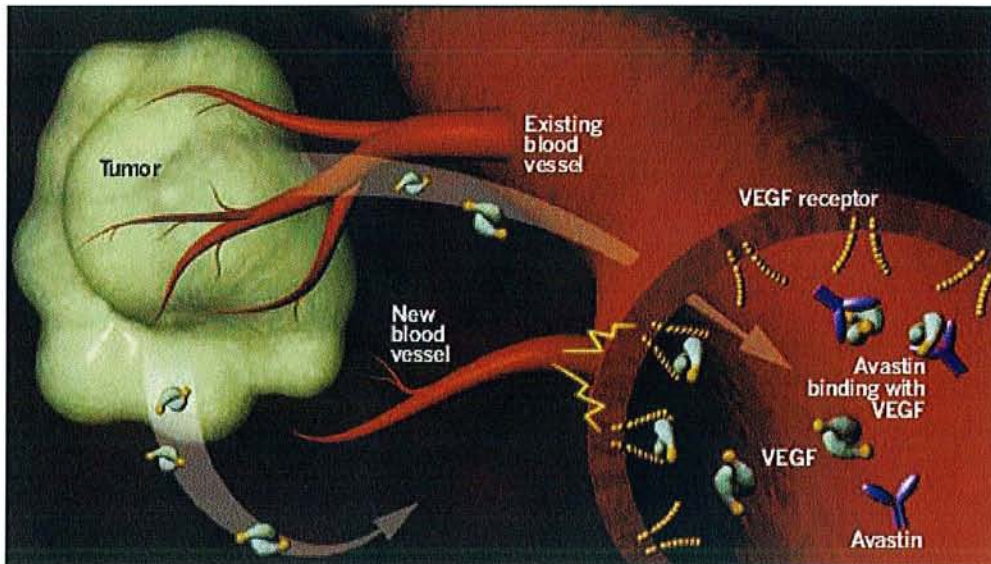


Figure 29 : Mode d'action de l'AVASTIN®

(D'après <http://7>)

Les voies de signalisation permettant la prolifération et la migration des cellules endothéliales ne sont pas activées. La croissance vasculaire est alors inhibée, et la survie des cellules tumorales n'est plus assurée.

Le bevacizumab permet, outre la régression des vaisseaux existants, de réduire la pression intra tumorale, avec comme conséquence une meilleure pénétration des molécules dans la tumeur.

De plus, les radiations ionisantes utilisées lors de la radiothérapie nécessitent de l'oxygène pour être efficaces, d'où la résistance des cellules tumorales hypoxiques. En inhibant le VEGF, la vascularisation tumorale créée est plus normale, d'où une meilleure oxygénation et ainsi le recours à la radiothérapie redevient une option envisageable.

La demi-vie de cet anticorps est de 17 à 21 jours. Jusqu'à présent, aucun anticorps anti-bevacizumab n'a encore été détecté, montrant ainsi le succès de l'humanisation.

Contrairement au cétuximab (Erbix®), la prescription du bévacizumab (Avastin®) ne nécessite pas d'étude du status VEGF sur biopsies ou pièce opératoire. De plus, l'utilisation de l'Avastin® ne concerne pas la situation d'échec à une ou plusieurs lignes de chimiothérapie en cancérologie colique métastatique. Les deux molécules sont donc dans leur indication complémentaires et non en concurrence directe.

L'étude princeps ayant testé l'apport d'Avastin® a été faite en première ligne métastatique dans le cadre des cancers du côlon. Elle comparait le protocole IFL (associant irinotécan, 5FU en bolus et l'acide folinique) avec ou sans Avastin®. Le gain est statistiquement effectif en termes de SG (survie globale) (15,6 mois vs 20,3 mois) ($p < 0,001$). Il en est de même pour la survie à 1 an (63,4 % vs 74,3 % ; $p < 0,001$), la durée moyenne de survie sans progression (SSP) (6,2 mois vs 10,6 mois ; $p = 0,004$) et le taux de réponse objective (RO) (34,8 % vs 44,8 % ; $p = 0,004$). Cette étude est donc clairement positive. Elle s'accompagne aussi d'effets secondaires. Un effet indésirable grade III/IV est apparu statistiquement plus souvent dans le bras Avastin® (74 % vs 84,9 % ; $p < 0,001$).

Ceux-ci vont induire une sélection des patients qui vont bénéficier de cette molécule à l'avenir. L'hypertension artérielle tout grade est survenue dans 22,4 % vs 8,3 % dans le bras témoin ($p < 0,01$). Une HTA non contrôlée est donc une contre-indication à l'Avastin®. La survenue d'épisodes thromboemboliques est l'autre particularité de ce type de traitement. Des cas de perforations digestives ont été rapportés uniquement dans le bras Avastin®.

On se doit de noter que le protocole IFL testé a été le gold standard aux États-Unis. Il ne l'est plus actuellement. Il n'a, par ailleurs, jamais été le protocole recommandé en Europe. Il a été remplacé par le Folfox (5FU, acide folinique et oxaliplatine) ou le Folfiri (irinotécan, 5FU en perfusion continue et acide folinique). L'IFL est associé à un taux d'effets secondaires beaucoup plus important.

Par ailleurs, l'étude de l'Avastin® a été faite chez des patients en état général plus précaire toujours en première ligne métastatique. Dans cette indication, Kabbinar rapporte une phase II randomisée portant sur 209 patients. Ils ont reçu soit 5FU et acide folinique plus Avastin® ou placebo. Il n'existe pas de différence en termes de SG. Par contre, il existe une différence statistique en termes de SSP (9,2 mois vs 5,5 mois ; $p = 0,0002$).

L'AMM obtenue début avril 2005 concerne les patients porteurs de cancer du côlon métastatique non opérable traité dans le cadre d'une association Avastin® et chimiothérapie à base de 5FU. Différentes contre-indications seront à rechercher comme l'hypertension artérielle non contrôlée, la susceptibilité à des pathologies thromboemboliques et l'existence d'une protéinurie effective. (Metges *et al.*, 2005)

❖ Bevacizumab et cancer bronchique non à petites cellules

L'étude de l'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 4599 présentée à l'ASCO 2005, a permis l'enregistrement par la FDA en octobre 2006 (AMM européenne en cours) du

bevacizumab pour le traitement du cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) avancé en association avec une chimiothérapie à base de platine en première ligne. Cette étude de phase III faisait suite à une étude randomisée ayant permis de retenir le schéma classique nord-américain carboplatine/paclitaxel associé à une injection de 15 mg/kg de bevacizumab toutes les 3 semaines. Sa particularité est surtout liée à la restriction à une population de patients atteints de cancer CBNPC d'histologie non-épidermoïde.

La phase II préliminaire avait permis d'identifier un risque hémorragique majeur (hémoptysie massive) en cas d'histologie épidermoïde (4 patients sur 13 soit 31 %), de notion d'hémoptysie antérieure, ou de tumeur à proximité des gros vaisseaux. Huit cent soixante dix-huit patients ont été randomisés entre 6 cycles de chimiothérapie avec ou sans bevacizumab. La SG, objectif principal, était significativement supérieure dans le bras bevacizumab avec une médiane de 12,3 vs 10,3 mois. Pour l'efficacité, tous les autres paramètres restaient en faveur du bras bevacizumab avec une SSP médiane de 6,2 vs 4,5 mois, un taux de réponse de 35% vs 15 %. Ceci reste vrai pour les analyses de sous-groupes, à l'exception des patients de sexe féminin (près de 50 % de la population) qui, malgré un meilleur taux de réponse, avaient une survie similaire dans les 2 bras (13,3 vs 13,1 mois). Les explications potentielles sont multiples, y compris un pronostic spontanément meilleur (survie médiane de seulement 8,7 mois pour les hommes). En ce qui concerne la tolérance, on retrouve les effets secondaires classiques du bevacizumab dont la majoration des effets secondaires de la chimiothérapie, y compris hématologiques, avec un risque plus grand de neutropénie fébrile. Il faut également insister sur le risque hémorragique ou thrombotique accru lié au bevacizumab.

En conclusion, la survie médiane du CBNPC avancé franchit pour la première fois la barre des 12 mois, ce qui représente l'avancée la plus significative de ces 15 dernières années, au prix toutefois d'une toxicité qu'il ne faut pas négliger et en se restreignant à une population dépourvue de risque hémorragique et d'histologie non-épidermoïde. (Deplanque, 2007)

❖ Bevacizumab et cancer du sein

La première étude de phase I/II avec escalade de doses a étudié le bevacizumab en monothérapie (3 mg/kg, 10 mg/kg et 20 mg/kg tous les 15 jours) chez des patientes traitées préalablement pour un cancer du sein métastatique. La dose la plus élevée a été associée à des céphalées.

La dose recommandée est ainsi de 10 mg/kg tous les 15 jours d'autant que davantage de réponses ont été observées à ce palier (6,7 %). Cette dose a été étudiée dans tous les essais de phase II et III qui ont été réalisés par la suite.

La première étude de phase III (AVF 2119 g) a comparé la capecitabine seule vs la capecitabine associée au bevacizumab chez des patientes traitées préalablement par anthracyclines et taxanes pour un cancer du sein métastatique. Cette étude a montré un taux de réponse plus élevé avec l'association bevacizumab et capecitabine (19,8 % vs 9,1 %, $p = 0,001$). Mais il n'existait aucun bénéfice en termes de SSP et de SG. La toxicité spécifique de la capecitabine n'a pas été modifiée par l'ajout du bevacizumab. Celui-ci a induit une hypertension artérielle (HTA) chez 23,5 % des patientes et a majoré le risque de thrombose (7,3 % vs 5,6 %). Cet essai a montré un signal d'activité de l'association bevacizumab et chimiothérapie et a motivé la réalisation d'une étude en première ligne thérapeutique.

Une autre étude de phase III a évalué en 1ère ligne thérapeutique, en phase métastatique, l'association du paclitaxel hebdomadaire avec le bevacizumab vs le paclitaxel hebdomadaire seul. Cet essai a été arrêté précocément du fait de la supériorité de l'association en termes de SSP. En effet, elle était de 13,3 mois vs 6,7 mois ($p < 0,0001$). Le taux de réponse globale était supérieur pour l'association thérapeutique 36,2 % vs 16,4 % pour la monothérapie ($p < 0,0001$). La SG était de 25,7 mois pour le bras combiné vs 23,8 mois pour le bras contrôle. Dans tous les différents sous-groupes, le bénéfice en terme de SSP était observé : quels que soit l'intervalle libre sans récurrence, le statut des récepteurs hormonaux, l'âge, le nombre de sites tumoraux, le traitement ou non par une chimiothérapie adjuvante. Malgré de nombreux essais, aucun facteur prédictif utilisable en pratique clinique n'a été formellement identifié pour savoir chez quel patient le bevacizumab serait le plus bénéfique.

Une HTA a été retrouvée dans 15 % des cas vs 2 % ($p < 0,0001$), une protéinurie dans 1% des cas vs 0 % ($p = 0,002$), des saignements dans 2 % des cas vs 0 % ($p = 0,002$). Les accidents thromboemboliques étaient similaires dans les 2 bras de l'étude. Le bevacizumab n'a pas modifié le profil de toxicité du paclitaxel.

Une telle amplitude en terme de bénéfice sur la SSP n'a jamais été vue dans des essais comparant des polychimiothérapies. La différence des SSP entre les mono et/ou polychimiothérapies des autres études est comprise entre 1,2 et 2,1 mois. L'addition du bevacizumab au paclitaxel a induit un bénéfice d'une amplitude de 6,6 mois. La durée de SSP du bras contrôle (paclitaxel hebdomadaire) est semblable à celles observées dans les autres études randomisées.

Le bevacizumab a ainsi tout naturellement obtenu l'AMM dans le cadre d'un cancer du sein métastatique en première ligne, en association avec le paclitaxel, en avril 2007.

De nombreux autres essais cliniques sont encore en cours dans le cancer du sein :

- Un essai de phase III (AVADO) qui a terminé son recrutement en mars 2007 étudie chez les patientes en 1ère ligne métastatique le docetaxel associé soit à un placebo soit au bevacizumab à la dose de 7,5 mg/kg ou de 15 mg/kg toutes les 3 semaines. L'objectif est de confirmer le bénéfice du bevacizumab combiné avec un taxane. De manière intéressante, cet essai évalue la possibilité d'utiliser des doses plus faibles de bevacizumab.
- Une étude de phase III (RIBBON 1) évalue chez les mêmes patientes l'efficacité d'une chimiothérapie comportant des anthracyclines ou des taxanes ou la capecitabine, en association avec un placebo ou le bevacizumab.
- Une étude de phase III (RIBBON 2) étudie l'efficacité et le profil de toxicité du bevacizumab associé à une chimiothérapie en deuxième ligne thérapeutique d'un cancer du sein métastatique.
- Une étude internationale de phase IV (ATHENA) évalue bevacizumab associé à une chimiothérapie à base de taxanes en 1ère ligne de traitement dans une cohorte de 2 000 patientes avec un cancer du sein évolué. Le bénéfice observé à la phase métastatique justifie le développement en adjuvant du bevacizumab.
- Deux études vont débiter chez des patientes HER-2 négatif. L'essai du groupe ECOG étudie chez les patientes ayant un envahissement ganglionnaire ou à haut risque de récurrence, une chimiothérapie adjuvante associée ou non au bevacizumab. La durée d'administration de l'anticorps pourra être de 6 mois ou d'un an. L'objectif de cet essai est de confirmer le bénéfice du bevacizumab combiné avec la chimiothérapie en situation adjuvante et d'évaluer la possibilité d'utiliser le bevacizumab pendant une durée plus courte.
- L'essai BEATRICE va étudier chez les patientes ayant une tumeur triple négative (récepteurs hormonaux et HER-2 négatifs), l'efficacité du bevacizumab associé à la chimiothérapie.
- Les données précliniques suggèrent l'existence d'interactions entre les voies de signalisation de HER-2 et de VEGF. Ainsi, des essais étudiant l'association du bevacizumab et du trastuzumab (anti-HER-2) ont montré des résultats prometteurs. Une étude de phase I chez des patientes présentant des tumeurs avec sur-expression de HER-2 a montré des résultats surprenants : 5 réponses partielles observées chez 9 patientes

traitées. Ceci a motivé l'initiation d'une étude de phase II. Les résultats préliminaires chez 37 patientes ont montré un taux de réponse globale de 54 %. Ces données sont prometteuses et elles constituent le rationnel de l'étude de phase III (AVEREL). Elle intéresse des patientes en situation métastatique d'un cancer du sein avec une sur-expression de HER-2. L'objectif est d'évaluer l'efficacité du bevacizumab associé au trastuzumab et au docetaxel, en 1^{ère} ligne de traitement.

3.3.1.2) Anti-VEGFR

3.3.1.2.1) Ribozymes

Ce sont des fragments d'ARN de ribosome de bactéries, doués comme une enzyme de propriétés catalytiques. Ils sont dits « substrats spécifiques », car ils servent d'intermédiaire au clivage catalytique des substrats ARN dont ils peuvent être extrêmement spécifiques. Un des avantages de leur utilisation est que peu de molécules sont nécessaires pour supprimer l'expression de la protéine cible dans la cellule.

Ils nécessitent une modification chimique pour maintenir leur stabilité et ils peuvent être utilisés pour supprimer spécifiquement la translation. Leur spécificité est liée à la structure à deux hélices de l'ARNm, l'une Helix 1 contenant 4 nucléotides et l'autre Helix 2 contenant 8 nucléotides. Le clivage de l'ARNm cible se fait par clivage entre ces deux hélices.

Dans un but anti-angiogénique, ces molécules sont utilisées contre les récepteurs VEGFR en modifiant leurs fonctions par clivage spécifique de leur ARNm (Glade-Bender *et al.*, 2003).

3.3.1.2.2) Inhibiteurs des TK

Sunitinib, SU11248, (SUTENT®)

Le sunitinib maléate a reçu l'agrément de la FDA en janvier 2006 dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales et des cancers rénaux métastatiques. Cet inhibiteur multityrosine kinase de bas poids moléculaire cible avec des affinités variables VEGFR-1 et 2, PDGFR α et β , cKIT et FLT3.

Le sunitinib est administré oralement et son absorption digestive est rapide, avec un taux maximal atteint en 5 heures. Il est très fortement lié aux protéines. Il est métabolisé au niveau hépatique par l'isoforme 3A4 du cytochrome P450 (CYP3A4) et aboutit à un métabolite actif,

le SU12662. L'utilisation de molécules inhibitrices du CYP3A4, comme le kétoconazole, expose les patients à une concentration de sunitinib circulant 2 fois plus importante. Au cours des différents essais de phases I et II, l'étude de la pharmacocinétique du sunitinib confirme une concentration maximale atteinte en 5 heures et une demi-vie de 40 heures. La prise d'aliments ne modifie pas l'absorption intestinale. Son métabolite actif, le SU12662, a une demi-vie supérieure à 80 heures.

La dose de 50 mg par jour pendant 4 semaines suivie de 2 semaines d'arrêt est le schéma retenu.

❖ Sunitinib et cancer du rein

Dans un essai clinique de phase II incluant 63 patients avec un cancer du rein métastatique réfractaire aux cytokines (87% de cellules claires), 40 % des sujets ont eu une réponse partielle, 27 % une stabilisation de plus de 3 mois. Le temps médian jusqu'à progression était de 9 mois.

Ces résultats ont été confirmés par une seconde étude de phase II ayant inclus uniquement les cancers du rein à cellules claires. (Loriot *et al.*, 2006)

Une analyse groupée de deux essais de phase II du sunitinib, après traitement cytokinique a montré un taux de réponse de 42 %, supérieur à celui obtenu en première ligne avec les cytokines. (Motzer *et al.*, 2006)

Il existe un rationnel clair pour l'inhibition du VEGF au cours du cancer du rein. En effet, le gène suppresseur de tumeur von Hippel-Lindau (VHL) est inactivé par délétion, mutation ou méthylation dans 60 à 80 % des cas sporadiques de cancer du rein à cellules claires.

Or, le gène VHL code pour une protéine impliquée, via HIF (hypoxia inducible factor), dans la régulation de la production de VEGF, PDGF et d'autres protéines induites par l'hypoxie.

L'inactivation de VHL entraîne une sur-expression de ces agonistes de VEGFR et PDGFR, et la stimulation persistante de ces récepteurs promeut l'angiogenèse, la croissance et la diffusion métastatique tumorale. Le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, avait déjà été montré efficace dans le cancer du rein.

Le premier essai de phase III a comparé en première ligne, chez 750 patients recrutés dans 101 centres, le sunitinib (ou SU11248 : 50 mg/j per os, 4 semaines sur 6) à l'IFN (9 millions d'unités trois fois par semaine en sous-cutané). Les patients devaient être en bon état général (statut de performance selon l'ECOG de 0 ou 1) et ne pas avoir de contre-indication au traitement anti-angiogénique (hypertension artérielle (HTA) non contrôlée, maladie ou

événement cardiovasculaire datant de moins de 12 mois, métastases cérébrales). (Motzer *et al.*, 2007) Un cross over vers le bras sunitinib était autorisé pour les patients progressant sous IFN. Hormis le syndrome pseudo-grippal spécifique de l'IFN, les effets secondaires de grade 3 étaient plus fréquents avec le sunitinib : diarrhée (5% vs 0 %), vomissements (4 % vs 1 %), HTA (8 % vs 1 %) et syndrome main-pied (5 % vs 0 %) ($p < 0,05$).

Les neutropénies (12 % vs 7 %), les thrombopénies (8 % vs 0 %) et les hyperlipasémies (16 % vs 6 %) de grade 3-4 étaient plus fréquentes avec le sunitinib ($p < 0,05$). Cependant, la tolérance était jugée meilleure avec le sunitinib, du fait notamment d'une fréquence moindre d'asthénies grade 3-4 (7 % vs 12 % ; $p < 0,05$), de même que la qualité de vie. La SSP en intention de traiter (ITT), critère de jugement principal de cet essai et évaluée, comme les réponses objectives (RO), par un comité de relecture radiologique indépendant, était significativement plus longue dans le bras sunitinib comparé au bras IFN : 11 vs 5 mois. Le taux de RO en ITT était également plus élevé : 31% vs 6% ($p < 0,001$).

Toutefois, aucune RO complète n'était observée. La SG médiane n'était pas encore atteinte dans les deux bras au moment de l'analyse. Le bénéfice conféré par le sunitinib était observé dans tous les sous-groupes de patients.

Cette étude est la première à démontrer dans le cancer du rein un avantage significatif d'un traitement anti-angiogénique face à la thérapeutique de référence ; cette preuve du concept positionne le sunitinib comme le nouveau traitement de référence en première ligne métastatique. De nombreuses études d'association sont également en cours.

Un schéma alternatif est aussi étudié, utilisant une dose réduite de 37,5 mg/j administrés en continu, les résultats n'étant pas encore disponibles à ce jour.

❖ Sunitinib et CBNPC

Soixante-quatre patients présentant un CBNPC ont été traités par sunitinib 50 mg/j, 4 semaines sur 6. Le nombre moyen de lignes de traitement antérieur est de 2 et il s'agissait d'une majorité d'adénocarcinomes (64 %). L'existence de métastases cérébrales était un critère d'exclusion. Le taux de réponse est de 9,6 % et le taux de stabilisation de plus de 8 semaines est de 43 %. La durée médiane de réponse est de 12,2 semaines et la survie globale moyenne de 24 semaines.

La toxicité est finalement lourde avec 3 décès, soit près de 5 % des inclusions (2 hémoptysies sur des carcinomes épidermoïdes et une hémorragie cérébrale sur métastase cérébrale).

Vingt-sept pour cent des patients ont présenté une asthénie de grades III-IV, 17 % des myalgies de grades III-IV, 10 % des vomissements de grades III-IV, 13 % une dyspnée de grade III et 5 % une HTA de grades III-IV. 5 % des patients ont présenté une thrombopénie ou une neutropénie de grades III-IV. Au final, 38 % ont dû arrêter le traitement pour toxicité. Ces résultats sont particulièrement prometteurs et des études randomisées sont en cours. À l'instar de ce que les profils de toxicités avaient imposé avec le bevacizumab dans les CBNPC, une sélection des patients paraît nécessaire. Il faut probablement exclure, dans un premier temps, les localisations cérébrales, pulmonaires centrales ou proches d'un gros vaisseau. (Ropert *et al.*, 2007)

❖ Sunitinib et cancers colorectaux

Quatre-vingt deux patients présentant un cancer colorectal métastatique résistant au moins à une première ligne de chimiothérapie ont été inclus dans un essai de phase II avec du sunitinib en monothérapie. Parmi ceux ayant déjà reçu du bevacizumab, on a observé 1 réponse partielle et 10 stabilisations (24 %). Pour ceux n'ayant jamais reçu de bevacizumab, il n'y a pas eu de réponse objective et le taux de stabilisation est de 35 %. La survie sans progression est de l'ordre de 2,3 mois.

Il s'agit encore de résultats prometteurs qui semblent montrer qu'une résistance au bevacizumab n'est pas prédictive de la réponse au sunitinib.

Le cas des tumeurs stromales et du sunitinib malade est conceptuellement différent. *A priori*, l'effet antitumoral est ici lié principalement à une inhibition directe de la croissance par inhibition de c-Kit et l'effet sur le stroma pourrait être plus secondaire. Dans ce cadre-là, le sunitinib est beaucoup plus qu'un agent anti-angiogénique.

❖ Sunitinib et GIST après échec de l'imatinib mésylate

Le traitement des tumeurs stromales a été révolutionné par l'introduction de l'imatinib mésylate. Néanmoins, ce médicament ne semble pas être en mesure d'éradiquer une maladie métastatique et le temps médian jusqu'à progression est de l'ordre de 18 à 26 mois. Les résistances secondaires sont en général liées à des mutations secondaires de c-Kit ou de PDGFR α .

Dans un essai clinique de phase III randomisé en double aveugle, 312 patients présentant une tumeur stromale ont été randomisés entre placebo et sunitinib 50 mg/j pendant 4 semaines puis 2 semaines de pause. Il existait 15 % de résistance primaire à l'imatinib et 85 % de résistance secondaire (au-delà de 6 mois). Le double aveugle a été levé après la première

analyse intermédiaire concluant à une différence significative entre placebo et sunitinib en termes de survie sans progression. Ainsi, en janvier 2006, la FDA a approuvé l'utilisation du sunitinib dans les GIST résistant à l'imatinib. (Ropert, 2007)

Sorafenib, Bay 43-9006, (NEXAVAR®)

Le sorafenib est un inhibiteur oral multicible ciblant RAF-1, B-RAF, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR- β , FLT-3 et c-kit sur les cellules tumorales, et les vaisseaux péri-tumoraux.

Dans les études précliniques à base de xénogreffes, le sorafenib est capable d'inhiber l'angiogenèse tumorale de nombreuses lignées tumorales incluant cancer du colon, du sein, cancer du poumon non à petites cellules.

Actuellement le sorafenib fait l'objet d'un développement clinique avancé, en particulier dans le cancer du rein, le mélanome, le carcinome hépatocellulaire et le cancer du poumon non à petites cellules en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie conventionnelle.

❖ Sorafenib et cancer du rein

L'efficacité du sorafenib dans le cancer du rein avancé a été rapportée à l'ASCO 2005. Reposant sur des résultats encourageants issus d'une phase II, 769 patients atteints d'un cancer du rein avancé, en échec d'un premier traitement étaient inclus dans une étude randomisée comparant le sorafenib (400 mg deux fois par jour) à un placebo. Malgré un taux de réponse très faible (2 %), la SSP était de 24 semaines dans le groupe sorafenib contre 12 semaines dans le groupe placebo ($p < 0,00001$). Celui-ci a donc reçu l'autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en décembre 2005 et en Europe en avril 2006.

Un second essai de phase III (TARGET), mené dans 117 centres dans 19 pays, a évalué en double aveugle contre placebo le sorafenib (400 mg 2 fois/jour), chez 903 patients atteints de cancer du rein à cellules claires métastatique, après progression sous ou dans les 8 mois suivant une première ligne par cytokine. Le cross over vers le sorafenib des patients progressant sous placebo a été autorisé dès la démonstration lors d'une analyse intermédiaire d'un bénéfice en SSP avec le sorafenib (5,5 vs 2,8 mois, $p < 0,01$). Ce bénéfice de SSP était observé dans tous les sous-groupes de patients. La SG (critère de jugement principal de cet essai) était également améliorée avec le sorafenib (non atteinte vs 14,7 mois ; $p = 0,02$) à la première analyse intermédiaire, mais de façon non (encore) statistiquement significative. Les taux de RO (toutes partielles) en ITT étaient plus élevés dans le bras sorafenib : 10 % vs 2 % ($p < 0,001$). Une seule réponse complète était observée.

L'HTA grade 3-4 (4 % vs < 1 % ; p = 0,001) et l'ischémie (incluant des infarctus) cardiaque (12 patients (3 %) vs 2 patients (< 1 %) ; p = 0,01), rares, étaient significativement plus fréquentes dans le bras sorafenib. Il n'y a pas eu de neutropénie fébrile ou de thrombopénie grade 4 ; l'anémie de grade 3-4 était de fréquence similaire dans les deux groupes (3 % vs 4 %). (Escudier *et al.*, 2007)

Les résultats préliminaires d'une étude randomisée de phase III vs placebo, ayant inclus près de 900 cancers du rein avancés de type carcinome à cellules claires, ont été présentés à l'ASCO 2005. Le taux de réponse global est faible à 2 % mais le taux de réponse stable est de 78 %. La survie médiane sans progression est de 24 semaines vs 12 semaines dans le bras placebo. Le bénéfice clinique pour cette majorité de patients en stabilisation est confirmé par un essai clinique de phase II randomisant à 12 semaines de traitement dans ce type de situation l'arrêt vs la poursuite du sorafenib. Après 6 nouvelles semaines de traitement, on observe 21 % de progression dans le bras poursuite du traitement vs 45 % de progression dans le bras placebo. A noter que dans cette seconde étude sur de petits effectifs, il n'a pas été noté de différence entre les types histologiques cellules claires et papillaires.

D'autres études de phase II en cours évaluent l'efficacité du sorafenib en première ligne de traitement, seule ou en association avec l'interféron.

Les principaux effets secondaires rapportés sont les suivants : rash cutané (34 %), diarrhée (33 %), syndrome pied-main (27 %), fatigue (26 %), hypertension (11 %).

Ces toxicités dose-dépendantes sont bien contrôlées par la réduction de dose ou par des traitements spécifiques. Toutefois, leur fréquence mérite d'être prise en considération car la prise concomitante de traitement symptomatique associé (lopéramide pour la diarrhée, traitement antihypertenseur) peut constituer une cause majeure d'inconfort chez le patient et in fine une mauvaise compliance dans la prise du sorafenib.

La physiopathologie de ces effets secondaires est très mal connue à l'heure actuelle.

Par ailleurs, comme pour les inhibiteurs de EGFR, la corrélation entre la survenue de certains de ces effets secondaires (rash et/ou diarrhée) et l'efficacité mérite d'être posée et approfondie. (Loriot *et al.*, 2006)

Il ne reste donc qu'une place probablement limitée aux cytokines, et notamment à l'IL-2, qui reste encore le seul traitement connu à pouvoir donner (dans environ 5 % des cas) une réponse complète prolongée en première ligne de traitement du cancer du rein métastatique.

❖ Sorafenib et CBNPC

Une étude de phase II en monothérapie a été conduite chez 52 patients atteints de CBNPC avancé, en progression après une ou deux lignes de traitement. Les principales toxicités enregistrées ont été la diarrhée, un rash cutané, une érythrodysesthésie palmoplantaire (syndrome pied-main), une fatigue et une hypertension en règle modérée. Un patient est décédé d'hémoptysie compliquant une cavitation de sa tumeur après irradiation 30 jours après l'arrêt du sorafenib. Aucune réponse objective n'a été constatée mais 59 % des patients étaient stabilisés après 8 semaines de traitement avec une médiane de survie sans progression et de survie respectivement de 11,7 et de 29,5 semaines. Une étude de phase III en combinaison avec une chimiothérapie de type carboplatinepaclitaxel vs chimiothérapie seule va prochainement débiter. (Gatzemeier *et al.*, 2006)

❖ Sorafenib et mélanome

En monothérapie, sur 22 patients présentant un mélanome métastatique, on note une réponse partielle et 12 stabilisations avec un temps médian jusqu'à progression de 4 mois. En association avec la dacarbazine, après deux cycles et sur 11 patients avec un mélanome métastatique, il y a 2 réponses partielles et 3 stabilisations. (Eisen, 2005) Dans un essai clinique de phases I-II, une association taxol-carboplatine-sorafenib va produire, sur 35 mélanomes métastatiques, 40 % de réponses partielles de plus de 6 mois et 43 % de réponses stables. Le taux de réponse semble plus élevé dans les localisations cutanées, sous-cutanées ou ganglionnaires. Le temps moyen jusqu'à progression est de 10 mois. Quatre vingt pour cent des patients n'avaient pas reçu plus d'un traitement systémique. Avec le taxol à 225 mg/m², le carboplatine AUC₆ et le sorafenib à 100, 200 ou 400 mg deux fois par jour, il n'y a pas d'excès de toxicité, ni de modification des différents paramètres pharmacocinétiques. (Flaherty, 2006)

Vatalanib, PTK787/ZK222584

Le vatalanib est un inhibiteur oral de plusieurs kinases comprenant VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 ainsi que PDGF-R et c-KIT à plus hautes concentrations. Les études précliniques sur xénogreffes chez la souris ont montré sa capacité à inhiber la croissance cellulaire et à réduire les microvaisseaux tumoraux. Plusieurs phases I ont étudié la vatalanib chez des patients atteints de tumeurs surexprimant le VEGF et les récepteurs au VEGF. Chez l'homme, le vatalanib est rapidement absorbé avec un pic plasmatique deux heures après la prise orale et

une demi-vie de quatre à six heures lors d'une prise unique quotidienne. Une phase I a donc étudié l'intérêt d'une prise biquotidienne compte tenu de la demi-vie courte du médicament. Les résultats des données de pharmacocinétique et de l'imagerie par résonance magnétique avec séquence dynamique ont permis d'établir que la dose quotidienne biologiquement active est supérieure à 1000 mg par jour et que la dose maximale tolérée est de 750 mg deux fois par jour.

Les toxicités retrouvées au cours des phases I sont similaires à celles induites par les autres inhibiteurs de tyrosine kinases antiangiogéniques, à savoir hypertension artérielle, céphalées, diarrhée, fatigue, nausée et vomissement. La fréquence des principales toxicités rapportées au cours des phases III sont les suivantes : hypertension (21 %), diarrhée (16 %), fatigue (15 %), nausée (11 %), vertige (9 %), accidents thromboemboliques artériels et veineux (6 %).

Le PTK787/ZK 222584 a montré au cours de son développement initial une activité sur de nombreuses tumeurs en particulier le cancer colorectal métastatique.

Deux études randomisées de phase III ont comparé un schéma associant FOLFOX4 et PTK-ZK (à la dose de 1250 mg par jour en une prise) au FOLFOX associé à un placebo dans les cancers du colon métastatiques en première et seconde lignes (respectivement, CONFIRM 1 et CONFIRM 2).

La première a inclus 1168 patients en première ligne de traitement. La SSP n'était pas significativement différente entre les deux bras (7,7 mois pour le groupe FOLFOX4 associé au PTK/ZK contre 7,5 mois pour le groupe FOLFOX4 associé à un placebo). De façon inexplicée, seul le sous-groupe de patients ayant un taux de LDH élevé avait une augmentation de la SSP.

Les résultats de la seconde étude récemment rapportée à l'ASCO 2006 ne retrouvent pas de bénéfice en terme de SG (12,1 contre 11,8 mois ; $p = 0,511$) alors que la SSP semble meilleure dans le groupe FOLFOX4 plus PTK/ZK (5,5 contre 4,1 mois ; $p = 0,026$) en particulier chez les patients avec un taux de LDH supérieur à 1,5 fois la normale. La signification de l'augmentation de survie sans progression dans cette sous-population de malades observée tant dans Confirm 1 que dans Confirm 2 n'est pas élucidée. Les résultats définitifs sont attendus.

Le vatalanib est en cours d'évaluation pour d'autres cancers en particulier les tumeurs stromales digestives, glioblastomes, cancer du poumon.

(Loriot *et al.*, 2006)

3.3.1.2.3) Autres inhibiteurs du VEGFR en développement

Le ZD6474 (ZACTIMA®) est un inhibiteur oral qui inhibe plusieurs cibles tyrosine kinases dont le VEGFR-2, EGFR et RET. Cette molécule inhibe donc deux voies principales de la carcinogénèse. Une phase I a montré que la dose recommandée de ZD6474 était de 100-300 mg/jour et quatre réponses partielles ont été observées dans les cancers du poumon non à petites cellules.

Des phases II dans le cancer du poumon non à petites cellules ont montré des résultats intéressants. Ce produit est actuellement en phase III. (<http://10>)

Le composé AEE788 est un nouvel inhibiteur oral de EGFR et du VEGFR. Cette double inhibition permet une inhibition de la croissance tumorale et des métastases dans des modèles murins. Cette substance est en évaluation dans les tumeurs solides en phase I.

L'agent AZD2171 est un inhibiteur du VEGFR, inhibant aussi le PDGFR- β et c-Kit. Ce composé a montré une inhibition de l'angiogénèse induite par le VEGF dans des modèles murins.

Une phase I a montré que la dose recommandée était de 45 mg/jour et que les effets secondaires les plus fréquents étaient des nausées, des diarrhées et de la fatigue. Cet agent est en phase III d'essai clinique, en association avec carboplatine et paclitaxel, dans le cancer du poumon non à petites cellules. (<http://10>)

Le composé AG-013736, l'axitinib (AGURON®), est un inhibiteur oral de VEGFR-1, VEGFR-2 et PDGFR- β . C'est un agent qui *in vitro* bloque la phosphorylation du VEGFR entraînant une inhibition de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales, et inhibe dans les modèles murins l'angiogénèse des tumeurs et la croissance des tumeurs murines, et humaines pulmonaires et coliques. Une phase I a été conduite chez des patients avec des tumeurs solides avancées. La dose recommandée a été fixée à 5 mg deux fois par jour. Les doses limitantes toxiques observées ont été l'hypertension, des hémoptysies et des stomatites. Des réponses ont été observées en particulier dans les cancers du rein. Une phase II a été conduite dans le cancer du rein avancé et a montré une activité thérapeutique très intéressante avec des taux de réponse de 40 % (réponse partielle) et 69 % des patients qui restaient en cours d'étude avec une maladie stable ou en réponse. (Loriot *et al.*, 2006) Une étude de phase

III est actuellement en cours, avec axitinib + gemcitabine, dans le traitement du cancer du pancréas avancé. (<http://10>)

Le pazopanib (GW786034) est un agent oral inhibiteur de VEGF-R, PDGFR α et β , et de c-kit. Son spectre d'activité et sa tolérance sont proches de ceux de l'axitinib. Il fait l'objet d'une étude de phase II randomisée après échec des cytokines. (Hurwitz *et al.*, 2005)

3.3.2) Drogues qui inhibent la dégradation de la matrice

La dégradation de la MEC étant essentielle à l'angiogenèse (en allouant l'espace nécessaire à la migration des cellules endothéliales d'une part, et en libérant de nombreux facteurs anti-angiogéniques séquestrés dans la matrice d'autre part) ; son inhibition revêt un intérêt non négligeable dans la thérapie anti-angiogénique. Par ailleurs, cette stratégie pourrait également limiter la migration des cellules cancéreuses.

Le Néovastat est un inhibiteur de l'angiogenèse agissant sur plusieurs fronts. C'est un inhibiteur des MMP-2, 9 et 12. En outre, il semble bloquer la fixation du VEGF sur le récepteur VEGFR-2.

Un essai de phase II a inclus 144 patients avec des tumeurs variables (dont 22 cancers du rein). Le néovastat était administré oralement deux fois par jour à la dose de 60 ou 240 mg par jour. La plupart des patients ont reçu une immunothérapie avant l'inclusion (75% dans le premier groupe à 60mg par jour et 43%, dans le second groupe). Deux réponses objectives ont été observées dans le second groupe. La médiane de survie était de 16,3 mois dans le second groupe contre 7,1 mois ($p = 0,01$) dans le premier. Le taux de survie à deux ans était de 0 % dans le premier groupe contre 36 % dans le second.

Le néovastat a également été étudié en phase III d'essai clinique dans le cancer du poumon à petites cellules (Batist *et al.*, 2002), et dans les cancers du rein (Escudier *et al.*, 2003). Les résultats n'étant pas probants, le développement de ce médicament a été stoppé.

3.3.3) Drogues qui inhibent les fonctions des cellules endothéliales

3.3.3.1) Les interférons

Leur activité anti-angiogénique est principalement indirecte. En effet, l'interféron alpha inhibe la sécrétion de VEGF, de bFGF, et d'IL8 par de nombreuses cellules, comme les fibroblastes, et des cellules cancéreuses.

L'interféron gamma induit la production d'une protéine anti-angiogénique, la protéine 10, induite par l'interféron (IP-10).

L'interféron alpha semble aussi agir de manière directe sur les cellules. En effet, des milieux conditionnés à partir de cellules transfectées par les rétrovirus codant pour l'interféron inhibent la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes capillaires.

L'interféron α a aussi montré une activité pro-apoptotique sur des cultures de cellules endothéliales.

Cependant, dans le cancer du poumon à petites cellules, le traitement par les interférons n'a apporté aucun bénéfice. (Shepherd & Sridhar, 2003)

3.3.3.2) La thalidomide et ses dérivés

La thalidomide est un médicament, initialement utilisé comme anxiolytique, qui a montré un effet très puissant sur la néo-vascularisation. Elle bloque l'angiogenèse induite par le bFGF, et bloque l'activité du TNF- α . (Rajkumar & Kyle, 2001) La thalidomide, ainsi que d'autres dérivés font actuellement l'objet de plusieurs essais cliniques dans le traitement du cancer. Son utilisation, notamment dans le traitement du myélome, a des résultats encourageants.

Un essai de phase II incluant 19 patients (14 évaluable) avec un cancer du rein avancé a testé la combinaison de faibles doses de thalidomide (100 mg/jour) à de l'IFN α (3 MUI/jour). Trois (21,4 %) réponses partielles et sept (50 %) SSP ont été obtenues. La SG était de 17,4 mois.

En pratique, le développement de la thalidomide dans le cancer du sein n'est plus d'actualité : une étude de phase II a été rapportée dans le cancer du sein : 28 patientes présentant un cancer métastatique prétraité ont été incluses et traitées avec 3 doses (200, 800 ou 1 200 mg/j). Aucune réponse objective n'a été rapportée ; il n'y a eu que 2 stabilisations, l'une d'une durée de 11 semaines avec arrêt pour toxicité neurologique de grade 3 et l'autre ayant duré 16 semaines. La toxicité n'était pas négligeable, particulièrement dans les bras fortement dosés et

les dosages sériques de VEGF n'ont pas montré d'action évidente de la drogue sur ce facteur de croissance.

Une deuxième étude italienne de phase II a confirmé ces résultats. (Morabito *et al.*, 2005)

Des analogues de la thalidomide plus efficaces sont actuellement développés. Parmi ces agents, le CC-5013 (lenalidomide) a été testé en phase I chez 20 patients avec des tumeurs cérébrales. Trois patients ont eu une SSP pendant cinq, six et sept mois. (Fayette *et al.*, 2006)

3.3.3.3) Autres

La squalamine, un stéroïde angiostatique extrait du foie de requin, a été testé dans le cancer du poumon, en combinaison avec une chimiothérapie et a pu améliorer la survie de certains patients. La squalamine a également prouvé son efficacité dans le traitement des souris xénogreffées avec des tumeurs ovariennes humaines. Elle augmente les effets du cisplatine. De façon intéressante, les cellules surexprimant HER2 sont résistantes au platine et cette résistance est supprimée quand le cisplatine est combiné à la squalamine.

Le 2-ME est en phase I d'essai clinique, dans le traitement des tumeurs solides. Il s'agit d'un métabolite de l'oestrogène endogène qui inhibe la prolifération tumorale via ses activités antiangiogéniques et proapoptotiques. Un essai de phase I sur 14 patients a démontré sa bonne tolérance avec une réponse partielle (cancer ovarien) et une SSP (cancer prostatique) de plus de dix mois. (Dahut *et al.*, 2003)

Les agents conventionnels utilisés à faible dose pour une période prolongée (chimiothérapie métronomique) peuvent montrer une activité clinique, probablement via l'inhibition de l'angiogenèse. Des travaux ont montré que le paclitaxel à faible dose en perfusion continue avait une toxicité directe sur les cellules endothéliales, effet augmenté par l'association avec le celecoxib. (Merchan *et al.*, 2004)

3.3.4) Autres stratégies à l'étude

3.3.4.1) Système Angiotensine/Endothéline

Les systèmes ET-1/ET_A-R et AngII/AT1R sont depuis plusieurs années des cibles thérapeutiques dans le domaine de l'hypertension, en liaison avec leur activité vasoconstrictrice. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs ET_A-R ou AT1R, ou d'inhibiteurs de l'ECA (iECA), fait désormais l'objet de protocoles cliniques établis.

Plus récemment, ces mêmes antagonistes ou inhibiteurs ont montré une activité antitumorale dans des modèles précliniques (pour les deux systèmes) et dans plusieurs essais cliniques (pour le système ET-1).

❖ Inhibition des systèmes ET-1 et Ang II dans des modèles animaux

Plusieurs modèles *in vivo* ont démontré le rôle d'antagonistes spécifiques d'ET_A-R, ET_B-R ou AT1R, ainsi que d'inhibiteurs de l'ECA (iECA), dans différentes étapes de la carcinogenèse : croissance tumorale, angiogenèse et formation de métastases.

L'effet bénéfique d'antagonistes des récepteurs d'ET-1 sur le développement de diverses tumeurs a ainsi été montré : un antagoniste d'ET_A-R (BQ123) permet de réduire la croissance de tumeurs hépatiques, tandis qu'un antagoniste non sélectif des récepteurs d'ET-1 (bosantan) ralentit l'évolution d'adénocarcinomes du colon vers un grade plus élevé.

Dans des modèles de souris athymiques, une diminution de la croissance de tumeurs humaines implantées a été obtenue à l'aide d'antagonistes spécifiques du sous-type de récepteur exprimé par la tumeur : ET_A-R (A127722) pour les tumeurs osseuses, ET_B-R (BQ788) pour les mélanomes.

Le blocage des récepteurs d'ET-1 peut conduire à une inhibition de l'angiogenèse, comme cela a été mis en évidence, avec un antagoniste d'ET_A-R (ABT-627), pour des carcinomes ovariens dans un modèle de xénogreffe.

Dans un modèle de xénogreffe de cellules de sarcome de Kaposi, l'invasion et la croissance tumorales sont également ralenties par l'utilisation d'un antagoniste non sélectif des récepteurs d'ET-1 (A-182086), du fait de l'inhibition de la production de MMP-2 et MMP-9.

Pour le système AngII, les premières observations montrant les effets anti-angiogéniques et antiprolifératifs de l'iECA captopril dans un modèle de fibrosarcome de rat ont par la suite été

étendues à divers types de tumeurs. En effet, l'utilisation du captopril permet d'atténuer la croissance tumorale et l'angiogenèse du carcinome pulmonaire de Lewis chez la souris, et de réduire de façon significative la taille des tumeurs dans des modèles de xénogreffes de carcinomes rénaux et de mélanomes humains. De plus, le captopril permet de diminuer le nombre de métastases pulmonaires et d'augmenter la survie des souris, en inhibant l'expression et l'activité des MMP-2 et MMP-9. Il est intéressant de noter que le captopril bloque l'activité de l'ECA, et donc la synthèse d'AngII, mais peut également avoir une action inhibitrice directe, indépendante de l'AngII, sur le site actif des MMP-2 et MMP-9. L'utilisation d'un autre iECA, le périndopril, permet également de réduire significativement la croissance et la vascularisation tumorales dans des modèles murins de carcinomes hépatiques et des voies ORL. Seul ou en combinaison avec d'autres traitements, il réduit l'angiogenèse tumorale en inhibant l'expression du VEGF, la migration des cellules endothéliales et leur formation tubulaire.

L'utilisation plus récente d'antagonistes spécifiques d'AT1R (candesartan, losartan) a également donné des résultats intéressants, avec une réduction de la croissance et de la vascularisation des tumeurs dans des modèles syngéniques de cancer rénal, de sarcome, de mélanome et de gliome, ainsi que dans des modèles xénogéniques de cancers de la prostate et de l'ovaire. Le candesartan s'est également révélé actif pour réduire le nombre de métastases pulmonaires provenant de carcinomes de Lewis et de carcinomes rénaux.

❖ Inhibition du système ET-1 dans des essais cliniques

Des essais cliniques impliquant l'inhibition du système ET-1 ont récemment été menés dans le contexte de thérapies antitumorales.

Le traitement du cancer de la prostate par administration orale d'un antagoniste d'ET_A-R, l'atrasentan (actuellement en phase clinique III), constitue ainsi un véritable progrès.

Une approche similaire, utilisant l'atrasentan, donne également de premiers résultats encourageants dans le cadre du traitement d'adénocarcinomes.

Les effets secondaires liés aux conséquences physiologiques du blocage d'ET_A-R par des antagonistes (maux de tête, hypotension, œdème périphérique) sont généralement limités, et bien tolérés. Ces premières données suggèrent que l'utilisation d'antagonistes spécifiques de sous-types de récepteur d'ET-1 pourrait être élargie aux différentes tumeurs exprimant ET_A-R ou ET_B-R. De plus, on peut supposer que l'action inhibitrice de ces antagonistes sur l'angiogenèse pourrait également contribuer à ralentir la progression tumorale.

De façon analogue à celle du système ET-1, l'inhibition du système AngII pourrait avoir des applications thérapeutiques antitumorales. L'observation d'effets bénéfiques d'un traitement à long terme par un iECA, inhibiteur de la synthèse d'AngII, dans des cas de cancers du sein ou du poumon, reste cependant sujette à controverse ; ces résultats doivent être confirmés. (Cazaubon *et al.*, 2006)

3.3.4.2) Stratégie thérapeutique fondée sur la lactadhérine

La lactadhérine étant nécessaire à l'effet du VEGF, l'équipe de JS Silvestre a considéré que cette molécule pourrait avoir un effet thérapeutique dans le traitement des maladies ischémiques.

Ils ont alors développé des plasmides codant pour la forme longue ou courte de la lactadhérine et démontré que l'administration, par la méthode d'électro-transfert *in vivo* de lactadhérine, en l'absence de VEGF exogène, induit une forte néovascularisation dans le membre inférieur ischémié des souris traitées. Cet effet semble lié à l'activation des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$.

En effet, l'adhérence de cellules endothéliales à des plaques de culture recouvertes de lactadhérine est bloquée par un anticorps anti- $\alpha\beta3$. De plus, l'administration de la protéine recombinante lactadhérine augmente, en l'absence de VEGF, la phosphorylation d'AKT dans des cellules endothéliales en culture.

Or, cet effet est diminué par l'utilisation d'un anticorps anti- $\alpha\beta3$ ou anti- $\alpha\beta5$, démontrant ainsi que la lactadhérine interagit avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ pour activer la protéine kinase AKT, et donc le processus angiogénique.

Ce travail démontre ainsi pour la première fois que la lactadhérine est exprimée dans les cellules vasculaires et joue un rôle clé dans la phosphorylation de la protéine kinase AKT par le VEGF, et par conséquent dans l'effet de ce facteur de croissance sur le processus de néovascularisation.

L'effet du VEGF par son récepteur VEGFR-2 requiert l'association de ce dernier avec l'intégrine $\alpha\beta3$ et l'inhibition de $\alpha\beta3$ diminue l'effet pro-angiogénique du VEGF.

Les résultats démontrent que la lactadhérine est un facteur endogène qui, en interagissant avec l'intégrine $\alpha\beta3$, module la voie de signalisation dépendante de VEGF/VEGFR-2.

L'activation des intégrines, même en l'absence de facteurs de croissance, peut affecter l'angiogenèse. Les travaux de Silvestre *et al.* prouvent que la lactadhérine interagit avec les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ et, par un mécanisme dépendant d'AKT, qu'elle est capable d'activer le développement de nouveaux vaisseaux dans un contexte ischémique en l'absence de VEGF exogène. Ainsi, une stratégie thérapeutique fondée sur la surexpression de lactadhérine pourrait être proposée dans le traitement des pathologies ischémiques. (Silvestre *et al.*, 2005)

Inversement, lorsque la lactadhérine est inactivée chez la souris, l'introduction du facteur de croissance VEGF n'entraîne plus d'angiogenèse : il n'y a plus de formation de vaisseaux sanguins en réponse à une ischémie.

Une étude des chercheurs de l'Hôpital Lariboisière et de l'Institut Curie montre en outre que la lactadhérine, à elle seule, peut remplacer le VEGF pour induire l'angiogenèse. (<http://8>)

La lactadhérine est ainsi une cible prometteuse pour de nouveaux traitements : en l'empêchant d'agir, on bloque l'angiogenèse et par conséquent le développement des tumeurs et, à l'inverse, sa stimulation favorise l'apparition de nouveaux vaisseaux et donc la réparation de tissus endommagés par l'ischémie.

REMARQUE :

A côté des agents antiangiogènes qui affectent directement les cellules endothéliales, il existe des stratégies qui ont pour but d'interférer avec certaines cellules non endothéliales (cellules stromales et murales, cellules hématopoïétiques et cellules tumorales) impliquées dans l'angiogenèse tumorale. Ainsi, le ciblage des vaisseaux tumoraux établis représente une thérapie alternative, probablement complémentaire à la thérapie antiangiogène. (figure 30)

Des agents antivasculaires (toxine, cytokine, etc.) sont délivrés spécifiquement aux vaisseaux tumoraux grâce à des molécules (anticorps, peptides, aptamères) qui lient des marqueurs vasculaires spécifiquement exprimés sur les vaisseaux sanguins tumoraux. Ces agents antivasculaires induisent une hémorragie ou la formation de thrombus au sein de la tumeur entraînant une réduction de la perfusion de la tumeur et ensuite une nécrose (Neri *et al.*, 2005; Tozer *et al.*, 2005).

Le combrestatine A-43-O-phosphate (CA-4-P) et les médicaments liés au 5,6-diméthylxhanténone-4-acide acétique (DMXAA) utilisés en combinaison avec des thérapies conventionnelles sont actuellement en phase clinique (Tozer *et al.*, 2005). Un essai de phase III est même en cours, avec une association CA-4-P + paclitaxel, dans le traitement du cancer anaplasique de la thyroïde. (<http://10>) La prodrogue phosphorylée CA-4-P est un analogue synthétique de la combrestatine, un agent se liant à la tubuline qui induit *in vitro* spécifiquement l'apoptose des cellules endothéliales proliférantes, et qui entraîne une réduction allant jusqu'à 90 % du flux sanguin tumoral dans des modèles de tumeurs xénogreffées. La cardiotoxicité est son principal effet secondaire. Il s'agit là avant d'un agent tout vasculotoxique plutôt qu'antiangiogénique.

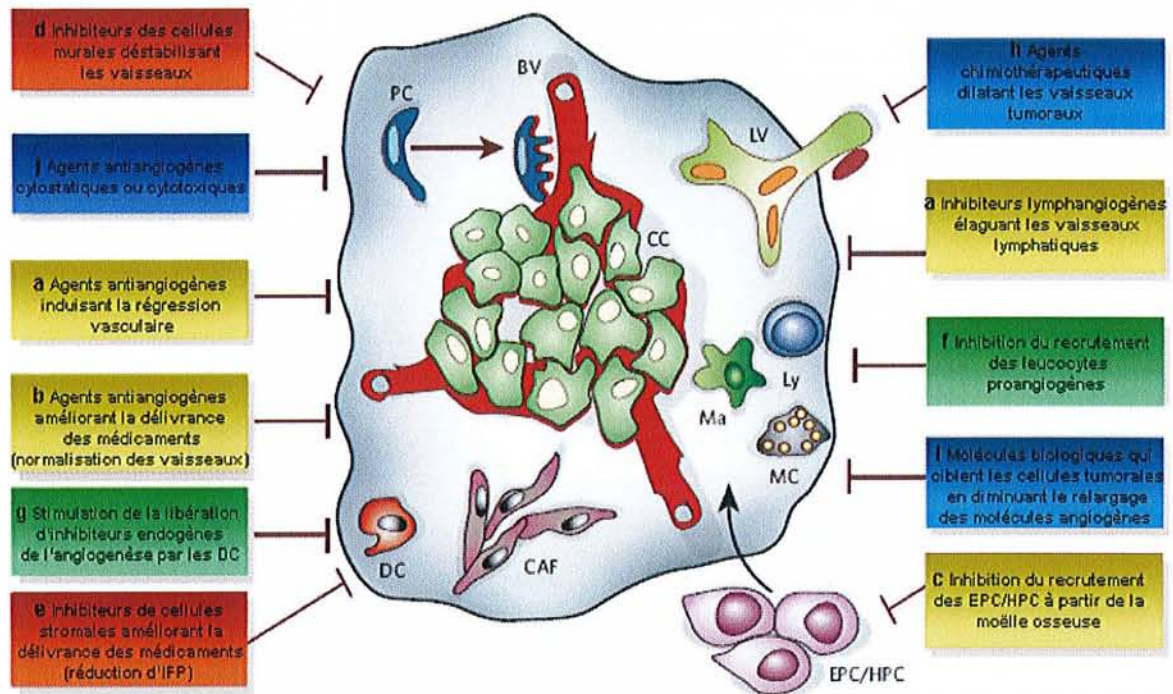


Figure 30 : Stratégies ciblant les cellules endothéliales et non endothéliales dans le but d'inhiber l'angiogenèse tumorale

Les encadrés jaunes montrent des agents (tels que des inhibiteurs du VEGF, la chimiothérapie métronomique et autres composés) qui ciblent les cellules (précurseurs) endothéliales (EPC); ils inhibent la (lymph)angiogenèse (a), induisent la régression (a) et la normalisation (b) des vaisseaux, et bloquent le recrutement des EPC (c). Les encadrés rouges montrent des agents (ex : inhibiteurs du PDGF) qui ciblent les cellules stromales et murales et déstabilisent les vaisseaux (d), réduisent le relargage de facteurs proangiogènes ou de cytokines, et diminuent la pression du fluide interstitiel (IFP), ce qui améliore la délivrance des médicaments (e). Les encadrés verts indiquent des agents (inhibiteurs du VEGFR-1, antagonistes des chemokines, etc.) qui ciblent les cellules hématopoïétiques et réduisent l'infiltration de précurseurs proangiogènes dérivés de la moelle osseuse et de leucocytes matures (c, f) et stimulent la libération d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans les cellules dendritiques (g). Les encadrés bleus montrent des agents ciblant les cellules cancéreuses (chimiothérapie, radiation, molécules biologiques ciblant les cellules tumorales) ce qui améliore la délivrance des médicaments par dilatation des vaisseaux tumoraux (h) et diminution de la libération de facteurs (lymph)angiogènes (i); certains agents antiangiogènes sont aussi cytotoxiques pour les cellules tumorales (j). BV, vaisseau sanguin; CAF, fibroblaste activé par un carcinome; DC, cellule dendritique; LV, vaisseau lymphatique; Ly, lymphocyte; Ma, macrophage; MC, mastocyte

(d'après Carmeliet, 2005).

3.3.5) Quantification de l'efficacité de ces thérapies

La dose maximale tolérée (DMT) des cytotoxiques est généralement associée au bénéfice clinique maximal. La DMT des anti-angiogéniques, dont la toxicité est dose-dépendante, n'est pas nécessairement la dose biologique optimale (DBO) en terme d'efficacité anti-tumorale. Celle-ci pourrait en effet être diminuée en cas de « normalisation » trop marquée de la vasculature tumorale, réduisant la délivrance tumorale non seulement de l'anti-angiogénique, mais aussi de la chimiothérapie éventuellement associée. Ainsi, la personnalisation de la DBO permettrait d'optimiser l'exposition tumorale à l'anti-angiogénique et d'en accroître l'efficacité, et ce à un niveau éventuellement inférieur à la DMT, épargnant au patient une toxicité inutile.

Les biomarqueurs utilisés sont alors différents en fonction de l'objectif visé. (tableau 5)

- Si celui-ci consiste à choisir en première ligne, ou ultérieurement en cas de résistance, le meilleur anti-angiogénique ; le profil d'expression tumorale des gènes pro- et anti-angiogéniques par immunohistochimie ou biologie moléculaire rendra mieux compte qu'un marqueur unique (expression du VEGF, etc.) des caractéristiques quantitatives et qualitatives de la vasculature tumorale ; caractéristiques variables en fonction du type, du stade, voire du génotype tumoral. Le coût, le caractère invasif et la lourdeur de ces méthodes pourraient être acceptables dans la mesure où elles ne seraient réalisées qu'une fois, avant la mise en route du traitement.
- Si l'objectif est de guider le traitement, le monitoring des cellules endothéliales circulantes (CEC) ou leurs progéniteurs (CEP), viables (censés diminuer sous traitement) ou au contraire non viables (censées augmenter), ou des protéines plasmatiques (VEGF, VEGFR-2) paraît plus adapté. Toutefois, les protéines « candidates » restent à valider, voire à identifier, et les méthodes de mesure (cytométrie de flux, RT-PCR, etc.) des CEC et CEP sont non consensuelles.

Tableau 5 : Biomarqueurs des anti-angiogéniques : cahier des charges

OBJECTIF	SOURCE BIOLOGIQUE	METHODES
Choix de l'anti-angiogénique (initial ou si résistance)	Tumeur	Profil d'expression angiogénique (<i>tissue</i> ou <i>DNA array</i>)
Titration, prédiction précoce du bénéfice clinique	Tumeur Sang	Imagerie fonctionnelle Protéines, CEC, CEP <i>Répétées, non invasives, reproductibles, peu coûteuses</i>

(D'après Malka, 2006)

Exemple de la mesure de la densité en microvaisseaux

Elle est effectuée au moyen de techniques d'immunohistochimie utilisant principalement le CD34 et le CD31. Cette mesure est faite dans les zones les plus fortement colorées. Les plus riches en microvaisseaux sont appelées « hot spots ». La sélection des « hot spots » est réalisée en scannant, à un faible grossissement, la totalité de la lame pour chaque échantillon. (figures 31 et 32)

Le comptage va s'intéresser à tous les capillaires et aussi à chaque cellule endothéliale isolée ou aux groupes de ces cellules. Par contre, les cellules inflammatoires sont bien évidemment écartées de ce comptage. La lecture débute à l'extérieur du réticule (viseur) pour se poursuivre à l'intérieur de celui-ci. Le résultat pour chaque tumeur est exprimé en MVD max (densité en microvaisseaux maximum) : nombre de vaisseaux le plus élevé noté au niveau d'un champ d'un des hot-spots et par la MVD moyenne (moyenne des valeurs obtenue dans l'ensemble des hot-spots).

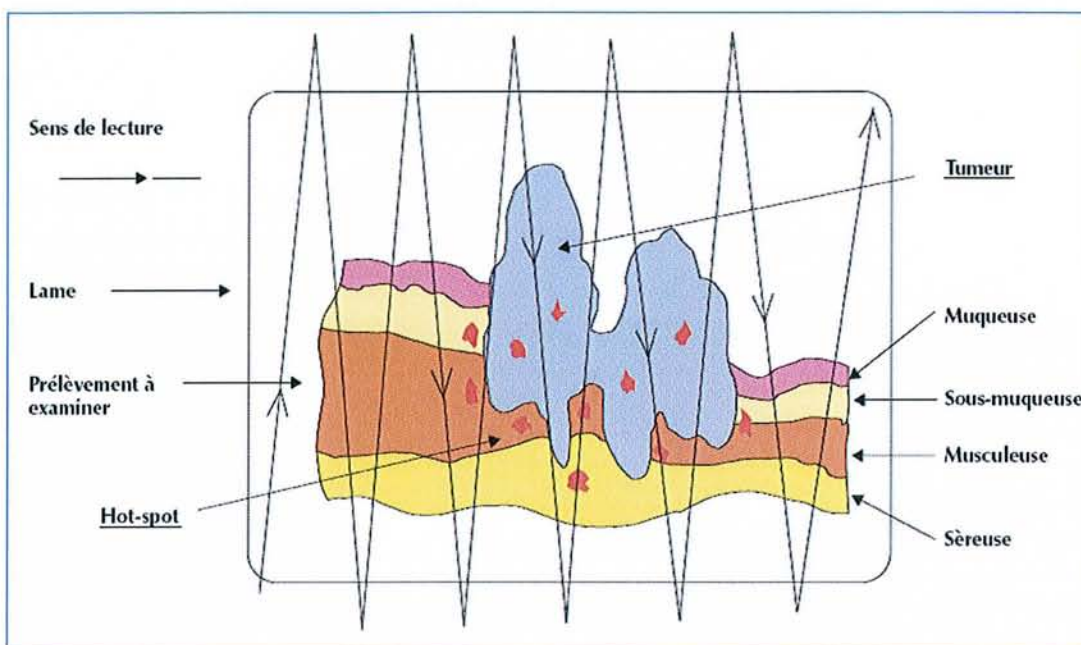


Figure 31 : Technique de repérage hot spot

(D'après Metges et al., 2005)

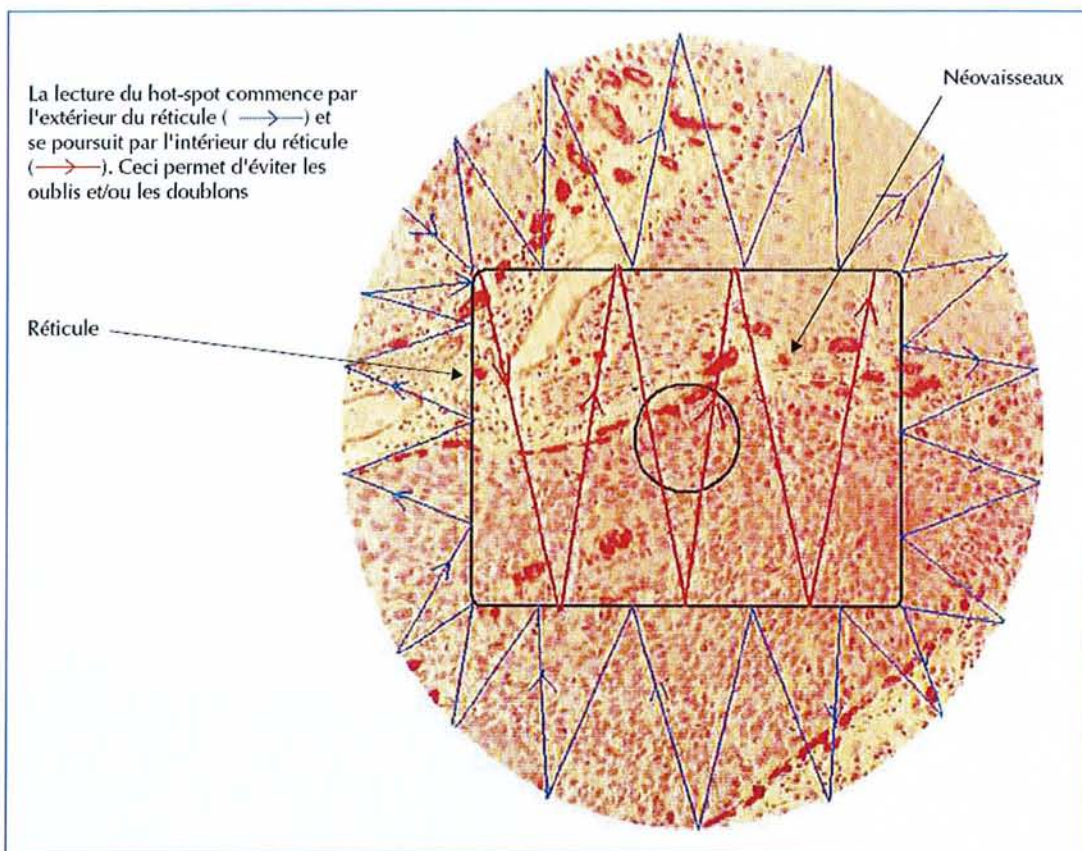


Figure 32 : Apprentissage de la quantification en microvaisseaux

(D'après Metges et al., 2005)

Pour évaluer le degré d'angiogenèse dans les tumeurs ainsi que la réponse à une thérapie anti-angiogénique, on peut également utiliser l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Comme nous l'avons vu précédemment, c'est une molécule d'adhésion impliquée dans les processus d'angiogenèse et de dissémination tumorale. Elle est exprimée à la surface des cellules endothéliales en prolifération mais aussi par certains types de cellules tumorales. Utilisant un anticorps monoclonal (LM609) couplé au Gd-DTPA, Cheresh *et al.* ont mesuré l'expression de cette intégrine par IRM dans un modèle de mélanome humain xénotransplanté chez la souris nude. (Cheresh *et al.*, 1998)

Par imagerie fonctionnelle, on peut mesurer des paramètres comme le flux sanguin, la densité vasculaire, l'index de taille et la perméabilité des vaisseaux. L'IRM est aujourd'hui considérée comme la technique de référence dans ce domaine. (Guilbaud *et al.*, 2005)

3.3.6) Durée optimale de traitement pour ces thérapies

Durée du traitement anti-angiogénique

Quelle est la durée optimale, s'il en existe une ? Un traitement prolongé comporte-t-il des risques ? Peut-on arrêter (et si oui, quand ?) un traitement anti-angiogénique sans compromettre le bénéfice clinique ? Faut-il au contraire poursuivre le traitement anti-angiogénique même en cas de progression ? Ces questions légitimes que se pose le clinicien, et parfois le patient, sont encore loin d'être résolues aujourd'hui, et nous n'avons que des éléments de réponse.

Cette durée de traitement ne peut se concevoir qu'au regard des bases résumées ci-dessous.

Éléments pouvant dicter la durée d'un traitement anti-angiogénique :

- **Mécanisme d'action supposé de l'agent considéré**
- **Enjeu du traitement anti-angiogénique**
- **Sensibilité de la tumeur traitée à l'agent en monothérapie et/ou association**

Premier exemple : si le mécanisme d'action supposé ou prépondérant est un phénomène de normalisation vasculaire, que le but du traitement antiangiogénique est palliatif et que la tumeur n'est pas sensible à l'agent considéré en monothérapie, on peut spéculer qu'un

traitement d'entretien en monothérapie sera probablement inefficace et ne permettra pas ou peu de retarder la progression tumorale.

Si, par contre, l'agent antiangiogénique en question continue d'être administré en association avec une chimiothérapie efficace, alors on pourrait potentiellement observer un bénéfice à la poursuite du traitement anti-angiogénique.

Un tel exemple pourrait se vérifier dans le cancer du côlon métastatique : dans une étude de phase II rapportée récemment au dernier congrès de l'ASCO 2007, la poursuite du bevacizumab en monothérapie d'entretien, après obtention d'une réponse ou stabilisation par l'association Folfiri/bevacizumab semble être inefficace en terme de SSP avec une médiane à 3 mois. (Smith *et al.*, 2007)

Un cas clinique plus ancien rapporté par l'équipe du MD Anderson faisait état d'un patient restant sous traitement prolongé par bevacizumab en association avec du 5-FU/acide folinique pendant près de 3 ans avec une stabilisation prolongée de la maladie et une progression tumorale rapide après arrêt du traitement qui était alors repris avec succès. (<http://9>)

Deuxième exemple : si le mécanisme d'action supposé est anti-angiogénique proprement dit, avec un but de traitement palliatif, et que la tumeur est sensible à l'agent considéré, alors le traitement peut être poursuivi jusqu'à progression tumorale en monothérapie en l'absence de toxicité limitante.

Un tel exemple existe pour le cancer du rein où le bevacizumab est actif modérément, essentiellement en allongeant le temps jusqu'à progression, et où les TKI sont actifs en monothérapie (sunitinib et sorafenib) et peuvent être poursuivis sur de longues périodes jusqu'à progression tumorale. (Jain, 2006)

On peut ainsi décliner de multiples manières mécanisme d'action/but du traitement/sensibilité tumorale. En situation adjuvante, si le mécanisme d'action prépondérant est une normalisation vasculaire pour une tumeur non sensible en monothérapie, la durée de l'anti-angiogénique ne se concevrait que tant que dure la chimiothérapie ; si le mécanisme d'action est anti-angiogénique avec une tumeur sensible, un traitement adjuvant prolongé couvrant la période de rechute maximale semble logique, c'est-à-dire souvent au minimum 2 ans. On remarquera qu'un traitement jugé inefficace en situation métastatique en monothérapie (par exemple, bevacizumab et cancers du côlon, poumon, sein) pourrait s'avérer potentiellement efficace en situation adjuvante, par le biais d'un mécanisme d'action prépondérant qui sera non plus un

phénomène de normalisation vasculaire et de facilitation de la chimiothérapie, mais un effet anti-angiogénique proprement dit et donc également antimétastatique.

Un traitement anti-angiogénique prolongé comporte-t-il des risques ?

Le recul reste insuffisant pour pouvoir répondre à cette question. Bien évidemment, la tolérance générale à un traitement, et son efficacité, dicteront son utilisation dans le long terme. Il existe un effet de classe des agents anti-angiogéniques avec des effets cardiovasculaires communs, tout particulièrement l'HTA, mais aussi le risque hémorragique ou thrombotique. Les TKI visant d'autres cibles que l'angiogénèse comportent aussi des effets secondaires généraux et cutanés.

Si l'on prend, par exemple, les données rapportées par deux larges cohortes de patients traités par chimiothérapie plus bevacizumab dans le cancer du côlon métastatique (études BRiTE et first BEAT regroupant près de 4 000 patients), on retrouve un arrêt définitif du bevacizumab dans seulement 1,5 % des cas pour toxicités. Dans ces deux études, on observe même moins d'effets secondaires graves de type thrombo-emboliques que dans les études princeps, ceci témoignant probablement d'une meilleure sélection des patients par les cliniciens dont l'expérience de l'utilisation du produit s'accroît.

Les données sur des traitements anti-angiogéniques prolongés restent peu nombreuses. Là aussi, c'est avec le bevacizumab qu'il existe le plus grand recul. Yang rapporte le cas de patients atteints de cancer du rein métastatique traité pendant plus de 5 ans, sans effets secondaires limitants. A noter toutefois que la protéinurie devient quasi constante, parfois importante, mais sans retentissement sur la fonction rénale. (Yang, 2004)

Ainsi les effets secondaires à long terme du bevacizumab semblent peu importants et plaident en faveur de son utilisation prolongée. Pour le sunitinib et le sorafenib les données restent en attente, mais là aussi certains patients atteints de cancer du rein (et de GIST (gastro-intestinal stromal tumor) pour le sunitinib) ont pu poursuivre leur traitement sur des périodes supérieures à 2 ou 3 ans.

Peut-on arrêter un traitement antiangiogénique sans compromettre le bénéfice clinique?

Les observations rapportées par Yang et Langmuir, ainsi que l'expérience clinique sur le terrain, font état de patients pour lesquels un traitement anti-angiogénique est suspendu, puis repris avec succès.

Ainsi pour des patients atteints de cancer du rein métastatique et répondeurs au bevacizumab, Yang rapporte le cas de 2 patients qui ont arrêté au bout de 2 ans (fin du protocole), ont présenté une nouvelle progression tumorale et ont alors repris le bevacizumab avec à nouveau l'observation d'une réponse et la poursuite du traitement pour 3 et 3,5 ans. (Yang, 2004)

Dans l'étude AVF0778g, sur les 35 patients inclus, 23 étaient en arrêt du bevacizumab depuis plus de 6 mois et 13 (soit 57 %) ont à nouveau présenté une réponse ou stabilisation avec la reprise du bevacizumab. (Langmuir, 2002)

Certaines données montrent que la recroissance vasculaire tumorale est très rapide, après arrêt des anti-angiogéniques, dès 8 jours, peut-être en raison de la persistance de manchons de membrane basale précédemment associés aux cellules endothéliales et formant de véritables «tunnels» à partir desquels la recolonisation vasculaire se fait. (Mancuso *et al.*, 2006) Par ailleurs, certains cliniciens ont observé sous traitement classique par sunitinib, qui s'administre de manière discontinue par cycles de 4 semaines sur 6, des repousses tumorales lors de la période de repos. Ceci a ainsi amené à réaliser deux essais de phase II dans les cancers du rein et les GIST avec un schéma continu de sunitinib. Des phases III sont en cours avec ce nouveau schéma continu qui semble mieux toléré.

Actuellement, on ne peut donc préconiser l'arrêt d'un traitement anti-angiogénique efficace en situation palliative en l'absence d'effets secondaires rédhibitoires. Néanmoins, en cas de demande de la part du patient ou de cas de force majeure, un arrêt peut se faire et un contrôle tumoral être à nouveau observé à la reprise du traitement.

Faut-il poursuivre un traitement anti-angiogénique même en cas de progression ?

Selon le concept de normalisation vasculaire, on s'attendrait logiquement à ce que le bevacizumab améliore l'efficacité d'une chimiothérapie de seconde ligne.

Par contre, encore une fois, un traitement chimiothérapique inefficace ne permettra pas d'obtenir un bénéfice en association avec le bevacizumab. On peut également noter qu'en cas de progression sous un traitement anti-angiogénique, un traitement avec un autre agent peut s'avérer efficace. Ainsi les cancers du rein avancés progressant sous bevacizumab sont contrôlés dans 81 % des cas sous sunitinib donné en rattrapage.

3.4) Etat des lieux

3.4.1) Traitements anti-angiogènes déjà disponibles

Certains traitements anti-angiogènes sont déjà commercialisés, ils sont illustrés par le tableau 6 qui nous précise leurs familles, cibles et indications respectives.

Tableau 6 : Molécules anti-angiogènes validées par la FDA

Molécule	Famille	Cible(s)	Indication (AMM)	Indication imminente
Bevacizumab (AVASTIN)	Ac monoclonal	VEGF	Cancer colique 1 ^{ère} ligne en associations au 5-FU/acide folinique +/- irinotécan Cancer du sein 1 ^{ère} ligne en association à la chimiothérapie	Cancer bronchique non à petites cellules en association à la chimiothérapie
Sorafénib (NEXAVAR)	TKI et Ser/Thr kinase inhibiteur	VEGFR-1 et -2, Raf kinases, c-kit, Flt-3, PDGFR β	Cancer du sein après échec IFN α ou IL-2, ou si immunothérapie non adaptée au patient	Carcinome hépatocellulaire avancé (statut de médicament orphelin)
Sunitinib (SUTENT)	TKI	VEGFR-1 et -2, c-kit, Flt3, PDGFR α et β	Tumeur stromale gastro-intestinale après échec de l'imatinib Cancer du rein en échec d'une immunothérapie par IFN α ou IL-2 Cancer du rein avancé ou métastatique en 1 ^{ère} ligne	

(D'après Massard, 2006)

Ces agents anti-angiogéniques ont des effets cardiovasculaires secondaires inhérents à leurs mécanismes d'action ; même si l'on espère qu'ils agissent surtout au niveau des vaisseaux anormaux localisés dans et autour de la tumeur, on ne peut exclure que ces médicaments aient des effets sur le métabolisme et les fonctions des vaisseaux « normaux ». Il est d'ailleurs intéressant de constater que les effets secondaires cardiovasculaires de ces trois agents sont très proches ; il s'agit donc très certainement d'effets de classe. Ceux qui sont le mieux documentés sont ceux du bevacizumab.

❖ Principaux effets cardiovasculaires indésirables liés au traitement par bevacizumab :

- L'hypertension artérielle (HTA) est l'effet secondaire le plus courant du bevacizumab associé à une chimiothérapie conventionnelle.

Elle est rapportée dans tous les essais cliniques ; son incidence totale est de 22 à 32 %, sa sévérité est marquée (grade 3 ou 4) chez 11 à 16 % des patients atteints d'un cancer colorectal avec métastases.

Dans une étude randomisée de phase II, comparant l'évolution de patients atteints de cancer colorectal métastasé et traités par bevacizumab associé au 5-FU/LV par rapport à ceux ne recevant que 5-FU/LV, les grades 3 et 4 d'HTA n'ont été observés chez aucun malade recevant 5-FU/LV seul mais chez 3/35 patients recevant 5mg/kg de bevacizumab en association. Il semble qu'il y ait un effet dose car 8 patients sur 32 recevant 10 mg/kg de bevacizumab présentaient une HTA de grade 3 ou 4.

Il semble que 10 à 15 % des patients, recevant la dose recommandée de bevacizumab, présentent une HTA nécessitant un traitement antihypertenseur (grade 3/4).

Les médicaments les plus couramment prescrits pour contrôler cette HTA sont des drogues de la famille des inhibiteurs de l'enzyme de conversion et des inhibiteurs des canaux calciques. Dans les essais publiés, un seul patient a dû être retiré du groupe traité par bevacizumab en raison de douleurs angineuses liées à une HTA non contrôlée.

- Les autres effets indésirables cardiovasculaires provoqués par le bevacizumab sont rapportés dans l'essai AVF2107g comparant deux groupes de patients traités par IFL + placebo (n = 412) ou IFL + bevacizumab (n = 403).

Pour l'essentiel, les auteurs rapportent une incidence significativement augmentée de l'HTA de grade 3 (10,9 vs 2,3 %), et non significativement des accidents thrombo-emboliques (19,3 vs 16,1 % majorés chez les patients âgés et ayant déjà des antécédents cardiovasculaires) et des saignements importants de grade 3 et 4 (3,1 vs 2,5 %). Les événements hémorragiques qui ont été observés au cours des essais cliniques étaient essentiellement des hémorragies associées à la tumeur et des saignements cutéanomuqueux mineurs. On peut ajouter les perforations intestinales dont l'origine est parfois liée aux effets vasculaires du bevacizumab (1,5 % vs 0) lorsqu'elle n'est pas liée à la pathologie associée.

❖ Mécanismes physiopathologiques des effets cardiovasculaires du bevacizumab :

Le rationnel de l'utilisation d'un anticorps monoclonal peut être résumé ainsi : on attend d'un « anti-VEGF » qu'il diminue la perfusion tumorale, qu'il réduise la densité microvasculaire dans et autour de la tumeur et qu'enfin il diminue la perméabilité endothéliale vasculaire. Par

ailleurs, le VEGF est connu pour activer l'expression de la NO-synthétase endothéliale et de la production de monoxyde d'azote (NO). Ce dernier ayant des effets vasodilatateurs et antiapoptotiques majeurs, on peut logiquement s'attendre à ce que l'inhibition du VEGF induise une réduction de la production de NO et donc une vasoconstriction responsable d'une augmentation de la pression artérielle.

La validité de ce mécanisme étiopathologique de l'HTA induite par le bevacizumab est renforcée par le fait que, dans la plupart des cas, l'arrêt du bevacizumab est rapidement suivi d'une normalisation de la pression artérielle.

Les effets biologiques du NO ne se limitent pas aux cellules vasculaires, le NO intervient également dans la régulation de l'hémostase ; il inhibe l'agrégation plaquettaire et l'adhésion des leucocytes à la surface endothéliale. En toute logique, on peut attribuer l'augmentation des accidents thromboemboliques observée en présence de bevacizumab à une diminution de la production et de la biodisponibilité du NO sanguin et vasculaire.

En ce qui concerne l'hypertension artérielle, d'autres mécanismes peuvent être évoqués. Il existe peu d'études sur ce sujet ; Veronèse ML *et al.* (2006) ont essayé d'élucider les mécanismes d'action du BAY 43-9006 (sorafenib), un inhibiteur de Raf kinase activé par le récepteur de type 2 du VEGF. Le dosage plasmatique des principaux facteurs humoraux impliqués dans la régulation de la pression artérielle, avant et 3 semaines après traitement, est décevant : les taux plasmatiques de catécholamines (épinéphrine, norépinéphrine), d'endothéline I, d'urotensine II, de rénine et d'aldostérone n'étaient pas modifiés par le traitement antiangiogénique alors même que la pression artérielle avait augmenté de manière significative. Les auteurs attribuent donc l'HTA à des facteurs adrénérgiques non humoraux.

Une autre hypothèse physiopathologique de l'HTA associée aux traitements anti-angiogéniques peut être avancée : plusieurs auteurs ont suggéré qu'une raréfaction microvasculaire, résultant d'une inhibition de l'angiogenèse microvasculaire, peut être responsable d'une élévation de la pression artérielle. La raréfaction microvasculaire est une composante normale du processus de vieillissement ; elle est accélérée et exagérée chez le sujet hypertendu comme chez le sujet adulte jeune ayant une prédisposition génétique à l'HTA. La diminution de la surface et du nombre de microvaisseaux (artérioles et capillaires surtout) entraîne une augmentation des résistances vasculaires périphériques et donc une HTA.

De plus, des expérimentations sur des modèles animaux ont montré que la raréfaction microvasculaire est un phénomène de cinétique rapide qui peut survenir en quelques jours.

Dans un travail récent, la densité capillaire cutanée chez 18 patients atteints de cancer colorectal a été mesurée, avant et 6 mois après un traitement comprenant du bevacizumab. Nous avons mesuré, chez ces patients, une augmentation significative de la pression artérielle (+ 14 mmHg pour la pression systolique et + 7 mmHg pour la diastolique, $p < 0,001$).

Bien entendu, seuls les patients ayant une pression artérielle de départ élevée ou « limite » ont atteint des niveaux de pression justifiant un traitement antihypertensif.

Cependant, chez tous ces patients, une raréfaction capillaire cutanée a été observée après traitement par bevacizumab (- 10 %, $p < 0,001$), corrélée à l'augmentation de pression artérielle. Dans tous les cas, une dysfonction endothéliale induite par bevacizumab a pu être démontrée.

Ce travail suggère que la dysfonction endothéliale (diminution de la production de NO) associée à une diminution de la densité microvasculaire est impliquée dans l'augmentation de la pression artérielle observée chez les patients ayant reçu un traitement anti-angiogénique.

De nombreuses questions restent encore en suspens :

- Quel est le schéma de traitement optimal pour minimiser les risques d'HTA tout en restant efficace sur la progression tumorale ?
- Quels groupes de patients vont développer une HTA ? Doit-on les traiter préventivement ? Doit-on limiter les doses des médicaments anti-VEGF chez ces patients ?
- Y a-t-il une ou plusieurs classes d'antihypertenseurs mieux adaptés au traitement d'une HTA post anti-angiogénique ?

(Levy & Mourad, 2006)

3.4.2) Traitements anti-angiogènes en essais cliniques

Les traitements anti-angiogènes en essais cliniques nous sont présentés dans le tableau 7, dont la mise à jour date du 13/08/07.

Tableau 7 : Essais cliniques en cours des inhibiteurs de l'angiogenèse

Mécanisme d'action	Thérapeutiques en essai	Phases d'essai
Blocage de la dégradation de la MEC	Daltéparine (FRAGMINE®)	III
Ciblage des activateurs de l'angiogenèse	ADH-1	I
	AG-013736 (axitinib, AGURON®)	III
	AMG-706	III
	Bevacizumab (AVASTIN®)	IV
	AZD2171	III
	Bay 43-9006 (sorafenib tosylate, NEXAVAR®)	III/IV
	BMS-582664	II
	CHIR-265	I
	GW786034 (pazopanib)	III
	PI-88	II
	PTK787/ZK222584 (vatalanib)	II
	RAD001 (everolimus)	III
	Suramin	II
	SU11248 (sunitinib malate, SUTENT®)	III/IV
XL 184	I	
ZD6474 (ZACTIMA®)	III	
Thérapeutiques sans mécanisme d'action spécifique	Celecoxib (CELEBREX®)	III
Thérapeutiques qui touchent les cellules endothéliales directement	CNGRC peptide TNF alpha conjugate	II
	Combretastatin A4 phosphate	
	Cyclophosphamide (Cytoxan)	III
	Dimethylxanthenone acetic acide	III
	Lenalidomide	II
	Soy isoflavone	IV
	Tamoxifen citrate	II
	Thalidomide	III
Inhibition du signal de survie transmis par les intégrines	ATN-161	II
	EMD 121974 (cilengitide)	II

(D'après <http://10>)

3.4.3) Officine et chimiothérapies par voie orale

La chimiothérapie anticancéreuse a longtemps été dominée par la voie intraveineuse avec des traitements difficiles, administrés lors d'hospitalisations prolongées ou répétées. Aujourd'hui les traitements sont administrés en ambulatoire, et la voie orale se développe. Actuellement, environ 5 % de l'ensemble des médicaments de chimiothérapie se prennent par voie orale. Lorsqu'elle est possible, la voie orale est une voie d'administration souhaitable car elle évite les problèmes septiques et apporte plus de confort au patient et lui permet de mener une vie sociale et familiale la plus normale possible.

D'après les recommandations de l'ANAES (agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé), «à efficacité équivalente, les formes per os sont à privilégier par rapport aux formes parentérales». Les laboratoires ont adapté les conditionnements afin de sécuriser leur produit par rapport au risque de surdosage et à l'environnement familial, et notamment les enfants (enveloppes plastiques scellables). Le livret de liaison d'information et de suivi a été imposé par l'AFSSAPS (agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) pour les nouveaux antitumoraux oraux.

3.4.3.1) Suivi et surveillance

Les pharmaciens d'officine sont en première ligne avec les sorties de la réserve hospitalière. Maillage géographique et formation pluridisciplinaire sont nos points forts. Notre rôle est d'accompagner au mieux les malades dans le suivi et la surveillance de la chimiothérapie orale, encore mal connue des patients et dont l'efficacité n'est pas dénuée d'effets indésirables. Nous devons assurer une bonne dispensation des traitements, combattre les idées préconçues et les idées fausses. Apporter un soutien relationnel et psychologique est aussi un de nos atouts. Nous avons la possibilité de nous coordonner avec les autres professionnels de santé (médecins, infirmières...) pour aider le patient à vivre avec sa maladie et construire une vie autonome autour de son traitement.

Eviter l'inobservance - Le pharmacien d'officine doit participer au bon suivi du traitement. Tous ces médicaments ont des effets indésirables que nous devons connaître et apprendre à

gérer. Le risque étant un manque d'observance, voire un arrêt du traitement.

Nausées et vomissements sont d'intensité variable selon la chimiothérapie utilisée.

Les complications retardées des chimiothérapies sont avant tout cardiologiques et/ou hématologiques.

Il peut également y avoir des complications cutanées : troubles pigmentaires, xérose, rash acnéiforme...Ce dernier, également appelé folliculite, est l'effet secondaire majeur de la classe des TKI.

Il existe 3 niveaux de prise en charge de cet effet indésirable :

- Sur le plan psychologique : il est important de prévenir les patients qu'il s'agit bien d'un effet secondaire, et non d'une intolérance ou d'une allergie.
- Sur le plan local : émollients, antibiotiques locaux sous forme de pommade ou crème, dermocorticoïdes, camouflage par du maquillage...
- Traitement par voie générale : antibiotiques, diminution des doses des TKI (rash dose-dépendant, mais au prix d'une possible perte d'efficacité anti-tumorale)
(Mateus, 2007)

3.4.3.2) Comment assurer un conseil officinal de qualité en cancérologie ?

Il faut tout d'abord bien connaître les produits (formation par les laboratoires, les DU d'oncologie...). L'écoute des patients est bien sûr capitale, même si les équipes hospitalières ont déjà bien expliqué la maladie et ses traitements. Avec la chimiothérapie per os, on peut déjà les rassurer, les molécules disponibles à ce jour n'entraînent pas d'alopécie. L'idéal serait d'avoir un rôle actif dans un réseau.

3.4.3.3) Quelles sont les particularités à gérer avec les chimiothérapies orales ?

Jamais nous n'avons eu de traitements avec une marge thérapeutique aussi étroite et des calculs de doses aussi fins... Les principales difficultés des chimiothérapies orales sont, nous l'avons vu, le suivi des effets indésirables, le suivi de l'observance, des interactions médicamenteuses en cas d'automédication, et le risque de banalisation de la thérapeutique prise au domicile dans un environnement moins contrôlé.

Un exemple : la neutropénie fébrile. En ville, il faut se souvenir que cela va très vite : l'erreur serait l'administration d'un anti-inflammatoire non stéroïdien, lors d'une douleur chez un patient présentant une neutropénie... Lorsqu'un patient sous chimiothérapie présente de la fièvre, il est impératif de lui dire qu'il y a urgence.

3.4.4) Les réseaux de santé en cancérologie

Le pharmacien est un acteur essentiel du Plan Cancer. Ce dernier place le patient au centre de la réflexion et de l'organisation des soins.

Nous avons un rôle de premier ordre à jouer dans tous les domaines de la lutte contre le cancer, depuis la prévention, le dépistage, la qualité et la sécurité des soins, l'accès à l'innovation thérapeutique, la recherche, jusqu'à l'accompagnement du patient pendant et après le traitement.

Le Plan Cancer associe sur un territoire donné, l'ensemble des acteurs, hôpitaux, cliniques, médecins et infirmières de ville..., ceci afin de permettre au malade de bénéficier d'une coordination des soins tout au long de son parcours. Les 54 000 pharmaciens exerçant dans 22 658 officines et les 4 300 pharmaciens exerçant en établissements de santé (2 671 pharmacies à usage interne) sont impliqués dans l'ensemble de ces domaines.

Le rôle du pharmacien d'officine

- rôle primordial de conseil aux patients et à leurs familles, tant sur les aspects thérapeutiques (modalités d'utilisation et de conservation des médicaments, effets indésirables, interactions médicamenteuses ou alimentaires, élimination des déchets, etc.) que sur les aspects administratifs (modalités de prise en charge, difficultés de remboursement, etc.),
- rôle pivot d'information, de conseil de proximité et d'alerte pour l'ensemble des membres d'un réseau,
- rôle renforcé en matière de pharmacovigilance étant en première ligne pour repérer les nouveaux effets indésirables inconnus ou pour identifier une fréquence anormale d'effets connus,
- partage de certaines activités avec les autres professionnels de santé impliqués au sein d'un réseau : visite de faisabilité au domicile du patient, information sur le bon usage, conseil et éducation thérapeutique.

Le pharmacien, d'officine ou hospitalier, a donc toute sa place dans les réseaux de cancérologie, que ce soit au niveau territorial et/ou au niveau régional.

Ainsi, il peut participer aux :

- réseaux territoriaux dont la dimension permet d'assurer aux patients une prise en charge coordonnée entre la ville et l'hôpital, continue et de proximité,
- réseaux régionaux de cancérologie, dispositif d'expertise régionale dont l'objectif est de mettre à disposition des professionnels des outils (ex. le dossier communicant de cancérologie) pour améliorer les pratiques professionnelles et donc le service rendu aux patients.

Dans tous les cas, cette démarche de participation des pharmaciens aux réseaux de cancérologie est volontaire. Des pharmaciens sont d'ores et déjà impliqués dans la dynamique réseau de cancérologie :

- ❖ par exemple, en assurant la coordination d'un réseau régional (réseau ARC ALPIN en région Rhône Alpes),
- ❖ ou encore en étant partie prenante dans le processus de mise en place d'un réseau de proximité (réseau ATHOS, réseau pour l'Administration des Thérapeutiques Hospitalières et des Soins à domicile, appliqué aux médicaments anticancéreux externalisables au domicile des malades suivis à l'hôpital Cochin à Paris).

Si les exemples concrets d'intégration des pharmaciens d'officine sont encore peu nombreux, le mouvement est en marche. Il en va ainsi pour le réseau Oncora (Rhône-Alpes) qui travaille sur la mise en œuvre du « projet pharmacien ». Ou encore pour Oncomip (Midi-Pyrénées) qui réfléchit sur la manière de mieux faire circuler l'information entre pharmaciens d'établissement de santé et pharmaciens d'officine ainsi que, plus largement, sur l'organisation de la prise en charge de proximité des patients. Pour Oncolor (Lorraine), un groupe « pharmaciens d'officine » au sein du réseau est en phase d'être relancé.

Principal intérêt d'une participation au réseau : la formation. Tous les réseaux réfléchissent actuellement sur la manière de l'organiser efficacement.

Autre atout du réseau : le pharmacien peut y rencontrer d'autres professionnels, faire part des problèmes rencontrés dans sa pratique quotidienne, dans la dispensation en ville.

(<http://11>)

CONCLUSION

A travers cette thèse, nous avons cherché à démontrer l'importance que revêt l'angiogenèse dans l'oncogénèse, et dans le traitement du cancer.

Nous avons donc illustré l'angiogenèse en tant que processus clé de la croissance et de la dissémination tumorale, et évoqué le nombre croissant d'essais cliniques en rapport avec celle-ci.

Nous avons également souligné les avancées majeures dans la compréhension du processus angiogénique, incluant ses voies de signalisation et leur régulation. Nombreuses sont ces voies dont le ciblage pourrait avoir un impact sur l'angiogenèse, et qui ne sont pas encore explorées. On pourrait ainsi envisager un ciblage thérapeutique à la fois en « parallèle » (actions sur la voie VEGF et d'autres voies déterminantes du processus tumoral), et en « série » (actions en différents points en amont et aval de la voie VEGF).

Les traitements anti-angiogènes offrent donc des perspectives des plus intéressantes ; d'autant plus qu'ils présentent des résultats encourageants en terme de prolongation de la vie, pour certains cancers de mauvais pronostic, tels que cancer du pancréas, ou cancer du rein métastatique. Jusqu'à présent, pour ces cancers, rien de probant n'était encore à disposition du praticien.

Malgré ces avancées substantielles, de multiples questions restent encore en suspens, quant à la durée optimale de ces traitements, quant aux combinaisons des thérapies conventionnelles de chimiothérapie et de ces nouveaux agents anti-angiogéniques... On peut spéculer sur le fait que la durée optimale du traitement dépendra essentiellement du trépied mécanisme d'action/enjeu du traitement/sensibilité tumorale, ainsi que du profil de tolérance du produit administré. Il faut de plus trouver de nouveaux modèles de développement clinique, qui doivent tenir compte des spécificités d'action et des toxicités propres de ces produits. Ces traitements soulèvent également la question d'un diagnostic moléculaire systématique, conduisant à l'établissement d'une carte d'identité des tumeurs ; pour une adaptation personnalisée des thérapies ciblées au patient, et donc un ciblage toujours plus précis de la tumeur.

Pour finir, il reste à insister sur le rôle à jouer du pharmacien d'officine. Les sorties de la réserve hospitalière des chimiothérapies par voie orale se faisant de plus en plus nombreuses, on pourra s'attendre à une généralisation des réseaux de cancérologie. Ces sorties obligeront également la profession à se former toujours d'avantage, dans un souci d'accompagner le patient au mieux dans sa maladie.



BIBLIOGRAPHIE

-A-

Alitalo KK. *Vascular Endothelial Growth Factors : Multiple roles in cancer*. West Conshohocken, Meniscus Educational Institute, 2004

Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J & Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 40-50

Asahara T, Takahashi T, Masuda H *et al*. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999 ; 18 : 3964-72

Assié G, Rosenberg D, Clauser E, Bertherot J. Biochimie des hormones et leurs mécanismes d'action : récepteurs membranaires. *Encyclopédie médico-chirurgicale* 2004 ; 10-001-C-10

-B-

Banerji U, O'Donnell A, Scurr M, *et al*. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in patients with advanced malignancies. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 4152-61.

Baselga J, Rojo F, Dumez H, *et al*. Phase I study of AEE788, a novel multitargeted inhibitor of erbB and VEGF receptor family tyrosine kinases: a pharmacokinetic (PK)-pharmacodynamic (PD) study to identify the optimal therapeutic dose regimen. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 ; 23: 3028a

Batist G, Champagne P, Hariton C, Dupont E. Dose-survival relationship in a phase II study of neovastat in refractory renal cell carcinoma patients. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002 ; 21 1907

Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf : a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 6771-6785

Bello L, Lucini V, Carraba G *et al*. Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase. *Cancer res* 2001 ; 61 : 8730-6

Bergers G, Javaherian K, Lo K, Folkman J, and Hanahan D. Effects of Angiogenesis Inhibitors on Multistage Carcinogenesis in Mice. *Science* 1999 ; 284 : 808-812

Bikfalvi A. Tumor angiogenesis. *Bull Cancer* 2003 ; 90 : 449-58.

Bikfalvi A. Recent developments in the inhibition of angiogenesis : examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF-VEGFR system. *Biochem Pharmacol* 2004 ; 68 : 1017-21

Blasi F, Carmeliet P. uPAR : a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002 ; 3 : 932-43

Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997 ; 390 : 404-7

Brooks PC, Silletti S, Von Schalscha TL. Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998 ; 92 : 391-400

Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ and Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005 ; 9 : 777-94.

-C-

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 2002 ; 296 : 1655-1657

Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol* 2004 ; 14 : 139-145

Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003 ; 9 : 653-59

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000 ; 6 : 389-95.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005 ; 438 : 932-6

Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005 ; 8 : 299-309.

Cazaubon S, Deshayes F, Couraud PO, Nahmias C. Endothéline-1, angiotensine II et cancer. *Med sci* 2006 ; 22 :

Cheresh DA, Kazemi MR, Sipkins DA *et al.* Detection of tumor angiogenesis in vivo by $\alpha v \beta 3$ -targeted magnetic resonance imaging. *Nat med* 1998 ; 4 : 623-6

Clavel G, Bessis N, Boissier MC. Avancées récentes sur l'implication de l'angiogenèse dans la polyarthrite rhumatoïde. *Rev Rhum Mal Osteoartic* 2003 ; 70 : 697-702

Compagni A, Wilgenbus P, Impagnatiello MA, *et al.* Fibroblast growth factors are required for efficient tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2000 ; 60 : 7163-9

Cross MJ, Dixelius J, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends in Biochem Sci* 2003 ; 28 : 488-493

Cudmore M, Ahmad S, Al-Ani B, Hewett P, *et al.* VEGF-E activates endothelial nitric oxide synthase to induce angiogenesis via cGMP and PKG-independent pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 ; 345 : 1275-1282

-D-

Dahut WL, Lakhani N, Kohn EC, *et al.* A phase I study of 2-methoxyestradiol (2ME2) in patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003 ; 22 : 833

Deplanque G. Le bevacizumab vient au secours du cancer bronchique. *VEGF actu : la lettre de l'angiogenèse* 2007 ; 6 : 5

Desai AA, Janisch L, Berk LR, Knowles HL, Rivera VM, Bedrosian CL, *et al.* A phase I trial of a novel mTOR inhibitor AP23573 administered weekly in patients with refractory or

advanced malignancies. A pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004 ; 46 : 3150

Dreys J, Medinger M, Mross K, et al. Phase I clinical evaluation of AZD2171, a highly potent VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 ; 23: 3002a

Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor : a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 2002 ; 21 : 4368-80

Dvorak HF, Nagy JA, Dvorak JT, Dvorak AM. Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* 1988 ; 133 : 95-109

-E-

Eisen T. Phase I trial of sorafenib combined with DTIC in metastatic melanoma patients. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 16S-7508

Ellis LM. The biology of VEGF and Tumor Angiogenesis in “*Horizons in cancer therapeutics : From Bench to Beside*”. West Conshohocken, Meniscus Educational Institute 2004 ; 4-9

Emami KH, Nguyen C, Ma H, et al. A small molecule inhibitor of β catenin/CREB-binding protein transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 12682-7

Escudier B, Venner P, Buckowski R, et al. Phase III trial of neovastat in metastatic renal carcinoma patients refractory to immunotherapy. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003 ; 22 : 844

Escudier B, Eisen T, Stadler W et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Eng J Med* 2007 ; 356 : 125

Espert L, Dusanter-Fourt I, Chelbi-Alix MK. Les régulations négatives de la voie JAK/STAT : implication dans la tumorigenèse. *Bull Cancer* 2005 ; 92 : 845-57

Etienne J, Clauser E, Housset C, Roingeard P. *Biochimie génétique, biologie moléculaire*. Paris, Masson, 2006

-F-

Fayette J, Soria JC, Armand JP. Le ciblage de l'angiogenèse en oncologie. *Pathol Biol* 2006 ; 54 : 199-205

Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 1999 ; 5 : 1359-64

Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003 ; 9 : 669-74

Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 2005 ; 438 : 967-74

Flaherty KT. Phase I/II trial of BAY 43-9006 in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 23 : 16S-3037

Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000 ; 156 : 361-81

Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971 ; 285 : 1182-6

Folkman J. Tumor angiogenesis : a possible control point in tumor growth. *Ann Intern Med* 1975 ; 82 : 96-100

Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis-dependent ? *J Natl Cancer Inst* 1991 ; 82 : 4-6

Folkman J, Sching Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992 ; 267 : 10931-10934

Fukami K. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem* 2002; 131: 293-299

Fuse E, Kuwabara T, Sparreboom A, Sausville EA, Figg WD. Review of UCN-01 development : a lesson in the importance of clinical pharmacology. *J Clin Pharmacol* 2005 ; 45 : 394-403.

-G-

Gabison EE, Hoang-Xuan T, Mauviel A, Menashi S. Métalloprotéinase et angiogènèse. *Pathol Biol* 2003 ; 51 : 161-66

Gatzemeier U, Blumenschein G, Fosella F, *et al.* Phase II trial of singleagent sorafenib in patients with advanced non-small cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 7002

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-A/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 23659-67

Gimbrone MA, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J. Tumor growth and neovascularization : an experimental model using the rabbit cornea. *J Natl Cancer Inst* 1974 ; 52 : 413-27

Glade-Bender J, Kandel J, Yamashiro D. VEGF blocking therapy in the treatment of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2003 ; 3 : 263-76

Goodwin AM, D'Amore PA. Wnt signaling in the vasculature. *Angiogenesis* 2002 ; 5 : 1-9

Guilbaud N, Duchamp O, Just N, Genne P. Rôle de l'imagerie non invasive du petit animal dans le développement des médicaments anticancéreux. *Bull Cancer* 2005 ; 92 (1) : 45-57

Griffin RJ, Molema G, Dings RPM. Angiogenesis treatment, new concepts on the horizon. *Angiogenesis* 2006 ; 9 : 67-72

-H-

Harris AL. Hypoxia : a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* 2002 ; 2 : 38-47.

Hawighorst T, Velasco P, Streit M, *et al.* Thrombospondin-2 plays a protective role in multistep carcinogenesis : a novel host anti-tumor defense mechanism. *Embo J* 2001 ; 20 : 2631- 40

Hilger RA, Scheulen ME, Strumberg D. The Ras-Raf-MEK-ERK Pathway in the Treatment of Cancer. *Onkologie* 2002 ; 25 : 511–518

Holash J, Thurston G, Rudge JS, Yancopoulos gd, Adjei AA, Bergers G, Pytowski B, Pegram M, Gordon MS. Inhibitors of growth factor receptors, signaling pathways and anigogenesis as therapeutic molecular agents. *Cancer Metastasis Rev* 2006 ; 25 : 243-52

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999 ; 99 : 81-92

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000 ; 100 : 57-70

Hurwitz H, Holden S, Eckhardt S, *et al.* Clinical evaluation of ZD6474, an orally active inhibitor of VEGF signaling, in patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002 ; 21: 325a

Hurwitz AD, Savage S, Fernando N, *et al.* Safety, tolerability and pharmacokinetics of oral administration of GW786034 in patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 ; 22 : 3012

-I-

Inoue M, Hager JH, Ferrara N, *et al.* VEGF-A has a critical, non-redundant role in angiogenic switching and pancreatic β -cell carcinogenesis. *Cancer Cell* 2002 : 193-202.

Itoh T, Tanioka M, Yoshida H. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient. *Cancer res* 1998 ; 58 : 1048-51

Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 2002 ; 416 :279-80

-J-

Jain RK, Munn LL, Fukumura D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. *Nat Rev Cancer* 2002 ; 2 : 266-276

Jain RK. Normalization of tumor vasculature : an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005 ; 307 : 58-62

Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006 ; 3 : 24-40.

Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signalling pathways as target in oncology drug discovery. *Invest New Drugs* 2006 ; 24 : 263-280

Johnson MD, Choi Kim HR, Chesler L. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase. *J Cell Physiol* 1994 ; 160 : 194-202

Johnson BE, Ma P, West H, *et al.* Preliminary phase II safety evaluation of ZD6474, in combination with carboplatin and paclitaxel, as 1st-line treatment in patients with NSCLC. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 ; 23: 7102a

-K-

Kalbacher E, Lorgis V, Chaigneau L. Les anti-angiogéniques dans le traitement des cancers du sein. *VEGF actu : la lettre de l'angiogénèse* 2007 ; 6 : 10-13

Kanthou C, Tozer GM. The tumour vasculature targeting agent CA-4P induces reorganization of the aktin cytoskeleton and early membrane blebbing in human endothelial cells. *Blood* 2002 ; 99 : 2060-9

Kim I, Kim HG, Moon SO, Chae SW *et al.* Ang-1 regulates endothelial cell survival through the PI3K/Akt signal transduction pathway. *Circ Res* 2000 ; 86 : 24-9

Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther* 2003 ; 2 : 1093-103.

Korpelainen EI, Karkkainen M, Gunji Y *et al.* Endothelial receptor tyrosine kinases activate the STAT signaling pathway : mutant Tie-2 causing venous malformations signals as a distinct STAT activation response. *Oncogene* 1999 ; 18 : 1-8

-L-

L'Allemain G. Rôle des voies Wnt dans l'oncogénèse. *Bull Cancer* 2006 ; hors série : 88-97

L'Allemain G. L'implication des éphrines et de leurs récepteurs en oncogénèse. *Bull Cancer* 2000 ; 87

Ladomery MR, Harper S, Bates DO. Alternative splicing in angiogenesis : The vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett.* 2006

Langmuir VK *et al.* Successful long-term therapy with bevacizumab (Avastin) in solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002 ; 21 : 32

Larger E. Hyperglycémie et angiogénèse. *Med Sci* 2003 ; 19 : 840-6

Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell Mol Med* 2002 ; 6 : 1-12

Lee JH, Canny MD, De Erkenez A. A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF₁₆₅. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 18902-7

Lelièvre E, Lionneton F, Soncin F. Rôle des facteurs de transcription ETS dans le contrôle de la spécificité d'expression endothéliale et l'angiogénèse. *Bull Cancer* 2001 ; 88 : 137-42

Levy BI, Mourad JJ. Les effets cardiovasculaires secondaires des anti-angiogéniques. *VEGF actu : la lettre de l'angiogénèse* 2006 ; 4 : 2-3

Li H, Lu H, Griscelli F, Opolon P, Sun LQ *et al.* Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist supresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice. *Gene Ther* 1998 ; 5 : 110-13

Liekens S, De Clercq E, and Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001 ; 61: 253-70.

Liu M, Howes A, Lesperance J, Stallcup WB, Hauser CA, Kadoya K, *et al.* Antitumor activity of rapamycin in a transgenic mouse model of ErbB2-dependent human breast cancer. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 5325-36.

Loriot Y, Massard C, Armand JP. Inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant le VEGFR. *Oncologie* 2006 ; 8 : 815–820

-M-

Mac Donald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis : from microscope to clinic. *Nat Med* 2003 ; 9 : 713-23

Malka D. Comment prédire l'efficacité anti-tumorale des anti-angiogéniques. *VEGF Actu : la lettre de l'angiogénèse* 2006 ; 3 : 1-2

Mancuso MR, Davis R, Norberg SM *et al.* Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J Clin Invest* 2006 ; 116 : 2610–2621

Manley PW, Bold G, Bruggen J *et al.* Advances in the structural biology, design and clinical development of VEGFR kinase inhibitors for the treatment of angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2004 ; 1697 : 17-27

Massard C. Thérapies moléculaires ciblées à l'ASCO 2006. *Oncologie* 2006 ; 8 : 654-656

Mateus C. Cutaneous effects related to the use of tyrosine kinase inhibitors. *Rev Pneumol Clin* 2007 ; 63 : 2S16-7

Matsumoto T, Turesson I, Book M, *et al.* p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF- 2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 2002 ; 156 : 149-60.

Matto V, Poutier A, Soncin F, Vandenbunder B. La morphogénèse de l'arbre vasculaire. De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives tumorales. *Med Sci* 1998 ; 14 : 437-47

Mazieres J, Pradines A, Favre G. Perspectives on farnesyl transferase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Lett* 2004 ; 206 : 159-67

Mendel DB, Laird AD, Xin X, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/ pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9: 327-337

Merchan JR, Jayaram DR, Supko JG, He X, Bublely GJ, SukhatmeVP. Increased endothelial uptake of paclitaxel as a potential mechanism for its antiangiogenic effects : Potentiation by Cox-2 inhibition. *Int J Cancer* 2004 ; 20 : 490-8

Metges JP, Volant A, Pera M, Robaszekiewicz M. Combattre la néo-angiogenèse tumorale, attaquer les voies d'activation du cancer ; les nouvelles voies dans la prise en charge des cancers digestifs. *Nouvelles thérapeutiques* 2005 ; 11 : 325-35

Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL and Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* 2006 ; 38 : 333-57.

Mitra SK & Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK–Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biology* 2006, 18:516–523

Mohanam S, Gladson CL, Rao CN, Rao JS. Biological significance of the expression of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPARs) in brain tumors. *Front Biosci* 1999 ; 4 : D178-87

Morabito A, Carillio G, Longo R, Gasparini G. Thalidomide is inactive in heavily pretreated patients with metastatic breast cancer. *Cancer J* 2005 ; 11 : 248-51.

Morabito A, De Maio E, Di Maio M, Normanno N, Perrone F. Tyrosine Kinase inhibitors of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors in clinical trials : current status and future directions. *The Oncologist* 2006 ; 11 : 753-764

Motzer J, Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2007 ; 356 : 115-24

Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA* 2006 ; 295 : 2516-24

-N-

Nalbone G, Alessi MC, Juhan-Vague I. Système fibrinolytique, métalloprotéases et pathologie vasculaire. *Med Sci* 2001 ; 17 : 170-6

Neri D, and Bicknell R. (2005). Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 436-46.

Nestor T, Masckauchan H, Shawber CJ, Funahashi Y, Chi-Ming L Kitajewski J. Wnt/ β -catenin signaling induces proliferation, survival and Interleukin-8 in human endothelial cells. *Angiogenesis* 2005 ; 8 : 43-51

Nicosia M. Angiogenesis as a target for cancer therapy : a primer in “*Horizons in cancer therapeutics*” West Conshohocken, Meniscus Educational Institute, 2005 ; 4-8

-O-

O'Donnell A, Faivre S, Judson I, *et al.* A phase I study of the oral mTOR inhibitor RAD001 as monotherapy to identify the optimal biologically effective dose using toxicity, pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) endpoints in patients with solid tumours. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003 ; 22 : 200

O'Farrell AM, Abrams TJ, Yuen HA, *et al.* (2003) SU11248 is a novel FLT3 tyrosine kinase inhibitor with potent activity in vitro and in vivo. *Blood* 101: 3597-3605

O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996 ; 2 : 689-92.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, *et al.* Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 ; 88 : 277-85

Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2001 ; 2 : 1-12

Ortega N, Sordello S, Plouet J. Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects. *Bull Cancer* 1997 ; 84 : 391-5

-P-

Papetti M, and Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002 ; 282 : C947-70.

Park JW, Chun YS, Kim MS. HIF-1-related diseases and prospective therapeutic tools. *J Pharmacol Sci* 2004 ; 94 : 221-32

Peek R, Kammerer RA, Frank S *et al.* The angiopoietin-like factor cornea-derived transcript 6 is a putative morphogen for human cornea. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 686-93

Pepper MS, Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique. *Med Sci* 2000 ; 16 : 1378-86

Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *Dev Dyn* 2000 ; 218 : 507-24

Pepper MS. Role of the MMP and PA-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 ; 21 : 1104-17

-R-

Rajantie I, Ekman N, Iljin K *et al.* Bmx tyrosine kinase has a redundant function downstream of angiopoietin and vascular endothelial growth factor receptors in arterial endothelium. *Mol Cell Bio* 2001 ; 21 : 4647-55

Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T *et al.* Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; 18 : 1188-96

Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene* 2002 ; 21: 3334-3358

Rajkumar SV, Kyle RA. Thalidomide in the treatment of plasma cell malignancies. *J Clin Oncol* 2001 ; 19 : 3593-5

Raymond E, Alexandre J, Faivre S, Vera K, Materman E, Boni J, *et al.* Safety and pharmacokinetics of escalated doses of weekly intravenous infusion of CCI-779, a novel mTOR inhibitor, in patients with cancer. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 2336

Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005 ; 434 : 843-50

Rini B, Rixe O, Bukowski MD, *et al.* AG-0133736, a multi-target tyrosine kinase receptor inhibitor, demonstrates anti-tumor activity in a phase 2 study of cytokine-refractory, metastatic renal cell cancer (RCC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005 ; 24 : 4509

Ropert S, Mir O, Armand JP. Les inhibiteurs oraux de la voie du VEGF. *Bull Cancer* 2007 ; 94 : S180-90

Rugo HS, Herbst RS, Liu G, *et al.* Phase I trial of the oral antiangiogenesis agent AG-013736 in patients with advanced solid tumors: pharmacokinetic and clinical results. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 5474-5483

Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 2005 ; 9 : 267-85.

-S-

Schaper W, Scholtz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 ; 23 : 1143-51

Shepherd FA, Sridhar SS. Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer. *Lung cancer* 2003 ; 41: S63-72

Silvestre JS, Levy BI. Role of matrix proteolysis in angiogenesis. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 2002 : 23-32.

Silvestre JS, Théry C, Hamard G *et al.* Lactadherin/MFG-E8 promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* 2005 ; 11 : 499-506.

Smith D *et al.* A phase II trial of maintenance bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer with response or stabilization after induction with bevacizumab-folfliri regimen: Preliminary results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2007 ; 26 : 389

Sounni NE, Janssen M, Foidart JM, and Noel A. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 2003 ; 22 : 55-61.

Suchting S, Freitas C, Eichmann A. L'angiogenèse passe sous contrôle du couple Delta-Notch. *Med Sci* 2007 ; 23

Suri C, Jones PF, Patan S *et al.* Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996 ; 87 : 1171-80



-T-

Thurston G, Mc Lean JW, Rizen M *et al.* Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 1401-13

Tobelem G. Les neuropilines : des récepteurs bifonctionnels. *VEGF actu – La lettre de l'angiogénèse* 2006 ; 1, 1

Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 423-35

-V-

Vianio S & Ikonen E. Macrophage cholesterol transport : a critical player in foam cell formation. *Ann Med* 2003 ; 35 : 146-55

Vandenbunder B, Faffeur V, Wernert N, Stehelin D. Analyse moléculaire de l'angiogénèse tumorale. *Med Sci* 1004 ; 10 : 516-27

Van Nimwegen MJ, Van de Water B. Focal adhesion kinase : a potential target in cancer therapy. *Biochem Pharmacol* 2007 ; 73 : 598-609

Varner JA, Cheresch DA. Integrins and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1996 ; 8 : 724-730

Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signalling. *Dev Cell* 2003 ; 5 : 367-77

Veronèse ML, Mosenkis A, Flaherty KT, *et al.* Mechanisms of hypertension associated with BAY 43-9006. *J Clin Oncol* 2006 ; 24 : 1363-9

-W-

Wallace EM, Lyssikatos JP, Yeh T, Winkler JD, Koch K. Progress towards therapeutic small molecule MEK inhibitors for use in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2005 ; 5 : 215-29

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991 ; 324 : 1-8

Willett CG, Duda DG, Jain RK. Surrogate biomarkers for anti-angiogenic therapy for advanced colorectal cancer. *Current colorectal cancer reports* 2007 ; 3 : 94-98

-X-

Xie B, Zhao J, Kitagawa M, *et al.* Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 19512-23.

Xu Q, Briggs J, Park S. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene* 2005 ; 24 : 5552-60

-Y-

Yang JC. Bevacizumab for patients with metastatic renal cancer: an update. *Clin Cancer Res* 2004 ; 10:6367S-70S

Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000 ; 407 : 242-8.

Yu JL, Rak JW, Coomber BL, *et al.* Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science* 2002 ; 295 : 1526-8.

-Z-

Zhao JH, Reiske H, Guan JL. Regulation of the cell cycle by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 1998; 143: 1997- 2008.

Zhong C, Zhong CH. STAT 3 : a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev* 2007 ; doi 10.1002/med.20101

Zhou L, An N, Haydon RC, *et al.* Tyrosine kinase inhibitor STI-571/Gleevec downregulates the β -catenin signaling activity. *Cancer Lett* 2003 ; 193 : 161-70

SITES INTERNET :

<http://1> :

<http://www.baclesse.fr/cours/fondamentale/c12-angiogenese/Angio-1.htm>

Dépendance des tumeurs vis-à-vis de l'angiogenèse, Centre de lutte contre le cancer de Basse Normandie

<http://2> :

<http://www.irrp.asso.fr/articles/article069.html>

DMLA et médicament Lucentis, des résultats prometteurs, Information et recherche sur la rétinite pigmentaire

<http://3> :

<http://medidacte.timone.univ-mrs.fr>

Angiogenèse et tumeurs, Université Médicale Virtuelle Francophone

<http://4> :

http://www.chuv.ch/cpo_research/introduction.html

CHU Vaudois Lausanne

<http://5> :

<http://www.angio.org/understanding/understanding.html>

List of Known Angiogenic Growth Factors and Angiogenesis Inhibitors in the Body, The angiogenesis foundation

<http://6> :

http://www.emdbiosciences.com/vegf_vascular_endothelial_growth_factor_interactive_pathway.htm

<http://7> :

<http://www.avastininfo.com/portal/eipf/pb/avastin/com/VEGFasthecentralmediatorofangiogenesis>, Genentech

<http://8> :

<http://ist.inserm.fr/basispresse/CPS/CPS2005/19avril2005-2.pdf> :

Angiogenèse : Une nouvelle cible pour bloquer le développement des tumeurs ou traiter l'infarctus, la lactadhérine, INSERM

<http://9> :

<http://www.cancerpublications.com/newsletter/colorectal/casestudies/v3n3/index.htm>

Cancer publications, Physicians' education resource

<http://10> :

<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table>

Angiogenesis inhibitors in clinical trials, NCI

<http://11> :

http://www.e-cancer.fr/v1/fichiers/public/pharmaciens_inca_9nov06_131106.pdf

Pharmaciens et Institut National du Cancer : partenaires pour la mise en œuvre du Plan Cancer

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 08 octobre 2007

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par **Claire BRAUER**

Sujet :

**Les médiateurs et voies de signalisation
intracellulaires impliqués
dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale :
nouvelles stratégies
thérapeutiques en cancérologie**

Jury :

Président : M. Jean-Louis MERLIN, Professeur

Juges : Mme Béatrice FAIVRE, Maître de conférences
Mme Catherine VALLANCE, Pharmacien Hospitalier

Vu,

Nancy, le 23 août 2007

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. Jean-Louis MERLIN,
Professeur

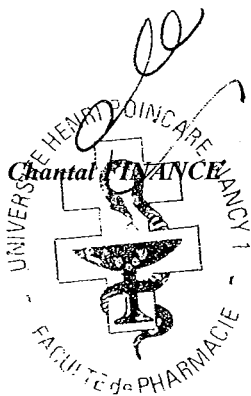
M. Jean-Louis MERLIN,
Professeur

(Signature)
Pr Jean-Louis MERLIN
Biologie cellulaire oncologique
Faculté de Pharmacie
5 rue Albert Lebrun
54001 NANCY CEDEX FRANCE

Vu et approuvé,

Nancy, le 31/08/07

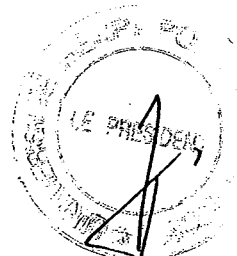
Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,



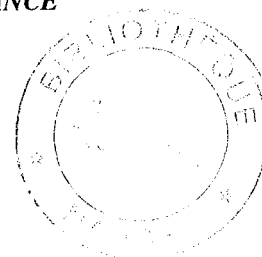
Vu,

Nancy, le 6.9.2007

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



Jean-Pierre FINANCE



N° d'enregistrement :

2844

N° Identification : 2844 75

TITRE :

Les médiateurs et voies de signalisation intracellulaires impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse tumorale : nouvelles stratégies thérapeutiques en cancérologie

Thèse soutenue le 08 octobre 2007
Par Claire BRAUER

RESUME :

La carcinogenèse est un processus multiétapes. Lors de la phase initiale, il existe un équilibre entre les phénomènes de prolifération et d'apoptose, la tumeur est avasculaire et sa taille reste inférieure à 2 mm. Le processus tumoral ne dépassera pas cette phase initiale dans la plupart des cas et seule une faible proportion de ces tumeurs entrera en phase de croissance. Pour croître et subvenir à ses besoins nutritifs, la tumeur aura besoin de développer sa propre vascularisation. Le mécanisme prépondérant auquel elle a recours est l'angiogenèse, qui est la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'autres, préexistants. Celle-ci est stimulée par de nombreux facteurs, dont le *vascular endothelial growth factor*. L'angiogenèse fait également intervenir de nombreuses voies de transduction du signal. Plusieurs types de champs d'action peuvent ainsi être définis pour la contrer :

- La liaison des facteurs angiogéniques à leurs récepteurs, au niveau des cellules endothéliales
- La transmission intra-cellulaire du signal
- Les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extra-cellulaire
- Les cellules endothéliales

De nombreuses molécules anti-angiogènes sont actuellement en essai clinique, quelques autres sont déjà commercialisées. Ces thérapies ne sont pas capables à elles seules d'éradiquer les tumeurs. L'intérêt est alors de les coupler avec des thérapies conventionnelles comme les chimiothérapies antitumorales ou la radiothérapie de façon à ce que la tumeur réduite puisse être éliminée ; restent à trouver les combinaisons et durées de traitements optimales pour chaque patient.

MOTS CLES : Angiogenèse, Signalisation, Cancer

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Pr Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire Oncologique EA3452	Bibliographique Thèmes 3 et 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

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