

# Le système des éphrines dans l'angiogenèse normale et tumorale

Bernard Lévy

Institut des vaisseaux et du sang, Hôpital Lariboisière, Paris, France

<bernard.levy@inserm.fr>

Les protéines de la famille des éphrines et leurs récepteurs ont été découverts par les spécialistes du développement et d'abord décrits comme des facteurs de « neuroguidage ». Les récepteurs des éphrines (Ephrin) sont désignés sous le nom générique de « Eph » ; ils comprennent 14 membres et constituent la plus grande famille des récepteurs à tyrosine kinase.

Chez les mammifères, on a décrit 9 récepteurs EphA (EphA1-8 et EphA10) et 5 récepteurs EphB (EphB1-4 et EphB6). Les récepteurs EphA se lient à 5 ligands EphrinA ; les récepteurs EphB sont activés par 3 ligands transmembranaires EphrinB [1] (tableau 1).

L'interaction entre les ligands Ephrin et les récepteurs Eph se fait au niveau des contacts inter-cellulaires ; elle induit une signalisation bidirectionnelle à partir du récepteur Eph (signalisation antérograde) et à partir du ligand Ephrin (signalisation rétrograde) [2].

L'EphrinB2 et ses récepteurs EphB4 jouent un rôle important au cours du dévelop-

pement vasculaire ; ils contribuent, d'une part, à la différenciation du réseau capillaire indifférencié primitif en artérioles, capillaires artériels, capillaires veineux et veinules. EphrinB2 est également indispensable à la stabilisation et au maintien du réseau vasculaire adulte [3]. En collaboration avec l'angiopoïétine 2, EphrinB2 maintient les péricytes au contact de la media et participe ainsi à la stabilisation du vaisseau adulte.

La délétion ciblée d'EphrinB2 dans les péricytes et les cellules musculaires lisses s'accompagne d'un œdème diffus et d'hémorragies multiples qui entraînent la mort des souriceaux quelques jours après leur naissance.

Les Ephrins B sont phosphorylées dans les vaisseaux en cours de formation ; l'inhibition de cette phosphorylation empêche le bourgeonnement endothélial et l'assemblage des nouvelles cellules en tubes primitifs stabilisés par l'assemblage des péricytes [4].

Dans les cellules endothéliales, la stimulation de EphB4 induit l'activation de la voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) et de la voie des MAPK (*mitogen*

*activated protein kinases*) entraînant ainsi la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

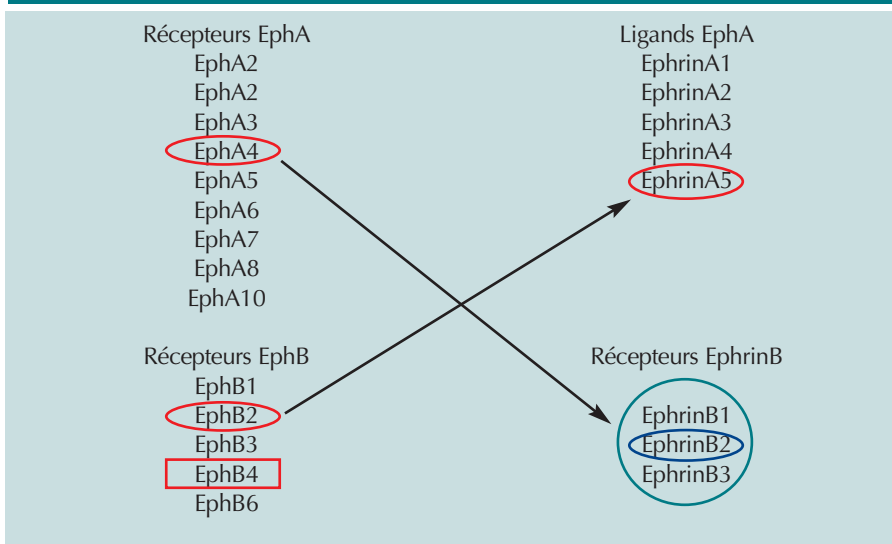
Les récepteurs EphB2 et EphB4 activent la phosphorylation de AKT induite par SDF1/CXCL12. La phosphorylation de EphrinB active transitoirement les kinases de la famille SRC et entraîne un bourgeonnement des cellules endothéliales. Enfin, la phosphorylation de EphrinB induit une phosphorylation dépendant de JAK2 et de la protéine STAT3, contribuant à l'assemblage des cellules endothéliales néoformées dans la matrice extra-cellulaire.

La stimulation des cellules endothéliales par EphrinB2 active les voies de la PI3K et des MAPK et induit leur prolifération et leur migration [5]. Leur activation par EphrinB1 permet la phosphorylation de JNK et augmente la migration et l'adhésion des cellules endothéliales [6].

EphrinB2 participe également au développement des vaisseaux lymphatiques et à l'angiogenèse par la régulation de l'internalisation et de la signalisation des récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 [7].

La régulation de l'expression des Ephrins et de leurs récepteurs est complexe et met en jeu plusieurs rétrocontrôles positifs et négatifs résumés dans la figure 1.

**Tableau 1. Interactions entre récepteurs EphA et EphB et leurs ligands EphrinA et EphrinB.**

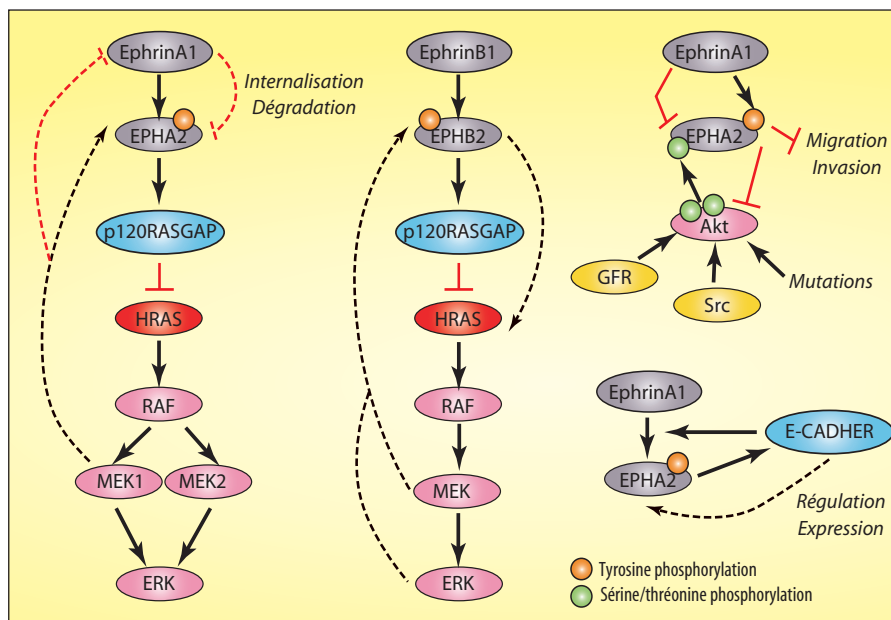


## Ephrines, angiogenèse et bourgeonnement endothélial

Le processus d'angiogenèse fait intervenir de nombreuses modifications des cellules endothéliales : bourgeonnement, élongation, élargissement, incorporation des précurseurs endothéliaux circulants, et formation d'une lumière capillaire au centre d'un tube endothélial primitif.

EphB4 et EphrinB2 interviennent dans plusieurs de ces processus. EphrinB2 est exprimée dans l'endothélium et dans les cellules de la paroi des vaisseaux adultes, aussi bien dans les artères, que dans les artérioles et les capillaires. Le niveau d'expression d'EphrinB2 augmente au cours de l'angiogenèse aussi bien physiologique que pathologique [4].

EphB4, le récepteur de EphrinB2, est plus largement exprimé dans les cellules endothéliales veineuses. De plus certaines cellu-



**Figure 1.** Les boucles de rétrocontrôle des Eph (d'après [2]). **(A)** Rétrocontrôle négatif Eph2/HRAS-ERK. L'activation de la voie HRAS-Erk par EphrinA1 augmente l'expression de EphA2 et diminue l'expression de EphrinA1. **(B)** Rétrocontrôles positif et négatif EphB2/ERK. L'activation par EphrinB de EphB2 stimule la voie HRAS-ERK et l'augmentation de l'activité de Mek et ERK augmente la réponse de EphB2 à EphrinB. EphB2 peut aussi inhiber la voie HRAS-ERK et réduire l'activation de EphB2 par les Ephrins. **(C)** Rétrocontrôle négatif EphA2/AKT. La voie des kinases AKT activée par les facteurs de croissance (GRF), les kinases de la famille SRC ou des mutations en amont phosphorylent EphA2 et provoquent une migration et une invasion cellulaires. **(D)** Rétrocontrôle positif EphA2/E-Cadherine. L'expression de la E-Cadherine augmente l'expression de EphA2, sa localisation à la surface cellulaire et l'interaction avec EphrinA1. La signalisation EphA2 augmente donc l'adhésion cellulaire médiée par la E-Cadherine.

les tumorales expriment EphB4 et les récepteurs EphA et EphB suggérant une implication fonctionnelle complexe du système des Ephrins dans les cellules et dans les vaisseaux tumoraux [8].

Le bourgeonnement endothélial au cours de l'angiogenèse est caractérisé par l'apparition de cellules différenciées en cellules en pointe « tip cells », qui forment des filopodes. Ces cellules lysent la membrane basale, la traversent et migrent en dehors de leur capillaire d'origine en réponse au gradient de VEGF-A dans les tissus environnants (figure 2).

Les cellules endothéliales néoformées constituent un cordon et les cellules qui se trouvent entre le capillaire d'origine et les cellules en pointe forment une tige (« stalk cells») reliant les tip cells au capillaire. Les voies de la signalisation de Notch et de VEGF sont à la source de la différenciation des cellules migrantes en cellules de type « tip » et en cellules de type « stalk ». Ces cellules « tiges » produisent des récepteurs solubles VEGFR1 qui neutralisent le VEGF-A environnant ; elles limitent ainsi la réponse angiogénique.

L'EphrinB2 participe au contrôle du bourgeonnement endothélial en régulant la fonction des cellules de pointe qui expriment fortement cette protéine [9]. EphrinB2 provoque l'internalisation de VEGFR2 et VEGFR3 dans les cellules endothéliales et régule ainsi leur réponse aux différentes isoformes de VEGF. L'inactivation de EphrinB2 dans les cellules endothéliales entraîne un défaut de signalisation des récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 ; elle a donc des effets anti-angiogéniques. Des anticorps dirigés contre EphrinB2 humaine inhibent, *in vitro* et en présence de VEGF, la migration des cellules endothéliales et la formation de tubes endothéliaux primitifs. De plus, les cellules endothéliales ont, lors du blocage de EphrinB2, un cytosquelette anormal [10]. Les anticorps anti-EphrinB2 réduisent considérablement la néo-vascularisation dans un modèle murin de matrigel. Ces mêmes anticorps administrés à la souris diminuent le nombre de vaisseaux sanguins et de lymphatiques dans des modèles de xéno-greffe et ralentissent la croissance tumorale. Ces résultats sont en faveur de l'introduction de l'utilisation d'anticorps dirigés

contre EphrinB2 comme une alternative ou en association avec les agents anti-angiogéniques habituels.

## Ephrines, remodelage et stabilisation vasculaire

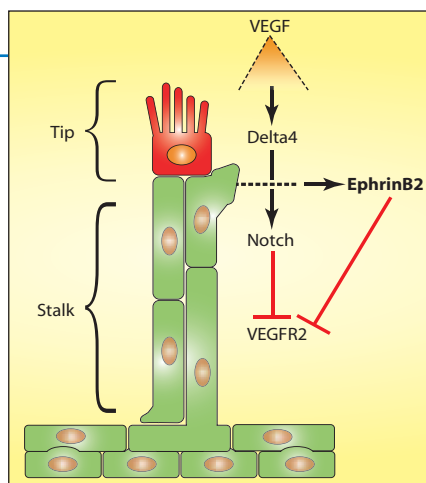
À la suite du bourgeonnement endothélial caractéristique, étape initiale de l'angiogenèse, certains capillaires néoformés régressent, les autres deviennent matures et fonctionnels (circulants) ; une membrane basale se forme, des péricytes et des cellules musculaires lisses sont recrutés, qui stabilisent la paroi vasculaire et assurent la survie et limitent la perméabilité de la couche de cellules endothéliales récemment apparues.

EphrinB2 joue un rôle indispensable dans le recrutement et l'adhésion des péricytes. L'inactivation d'EphrinB2 ciblée dans les cellules vasculaires provoque, chez l'embryon, des oedèmes et des hémorragies massives responsables de la mort périnatale. Les péricytes n'expriment pas EphrinB2 semblent morphologiquement normaux mais ne recouvrent pas les néo-vaisseaux et n'assurent pas leur rôle de stabilisation [11].

## Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse est nécessaire à la croissance de la tumeur primitive dès que celle-ci dépasse la dimension de 1 à 2 mm ; elle est principalement liée au VEGF-A produit par les cellules tumorales hypoxiques.

L'angiogenèse tumorale présente des particularités notables [12]. La principale est l'absence de l'autolimitation qui est responsable d'un processus persistant qui ne cesse donc pas une fois le vaisseau formé. Ce dernier a lui-même une structure désorganisée ; il est fragile, perméable, pauvre en péricytes, et saigne facilement. Certaines cellules tumorales, en particuliers celles des mélanomes et des glioblastomes subissent une transformation appelée « mimétisme vasculaire ». Des cellules tumorales acquièrent un phénotype caractéristique des cellules endothéliales et participent à la formation de la paroi des néo-vaisseaux. Ces cellules et donc les vaisseaux qu'elles constituent ont une indépendance relative aux voies du VEGF, soit en développant des processus d'angiogenèse indépendants des VEGF, comme par exemple le facteur pro-angiogénique Bv8 dérivé des neutrophiles, appelé aussi prokineticin 2, soit en sécrétant des agents neutralisant les VEGF comme les complexes Dll4/Notch, Angiopoïétine-1/Tie2 et Angiopoïétine-2/Tie2, PDGF/ récepteurs  $\beta$  du PDGF et TGF $\beta$ 1/ récepteur du TGF $\beta$ .



**Figure 2.** Bourgeonnement de cellules endothéliales à partir d'un capillaire existant. Les cellules invasives sont les cellules de pointe (tip cells) caractérisées par des extensions en forme de filopodes. Les cellules reliant le capillaire aux cellules de pointe sont appelées cellules tiges (stalk cells). La cascade VEGF/VEGFR2, Notch et Delta4 participe au contrôle et à la régulation de l'angiogenèse. EphrinB2 est fortement exprimée par les cellules de pointe et participe au contrôle du bourgeonnement endothélial. EphrinB2 provoque également l'internalisation de VEGFR2 et VEGFR3 dans les cellules endothéliales et régule ainsi leur réponse aux différentes isoformes de VEGF.

Le système des Eph/Ephrin régule également la signalisation VEGF/VEGFR dans un contexte tumoral. *In vivo*, les souris déficientes en EphrinB2 ont une angiogenèse diminuée en rapport avec un déficit en cellules endothéliales de type « tip cells » qui ont moins de filopodes et sont moins fonctionnelles. Dans des modèles tumoraux, l'invalidation de EphrinB2 diminue la vascularisation et la croissance tumorales. L'internalisation de VEGFR2 est nécessaire pour l'activation des voies de signalisation de ce récepteur et pour le développement des filopodes. EphrinB2 semble contrôler l'internalisation de VEGFR2 ; son absence limite donc les effets pro-angiogéniques de VEGF. En ce sens, le blocage de la signalisation rétrograde de EphrinB2 pourrait être une stratégie anti-angiogénique intéressante qui agirait en bloquant la signalisation de VEGFR2. De nombreux types de cellules tumorales expriment à la fois les ligands et les récepteurs Eph qui peuvent stimuler ou être stimulés par les molécules Ephrin dans l'endothélium et le microenvironnement tumoral. Les effets du système Eph/Ephrin peuvent donc être très différents selon les tumeurs : pas d'effet, activation ou inhibition de l'angiogenèse tumorale [4]. On a rapporté, dans le cancer du côlon et dans le cancer du sein par exemple, que la stimulation de EphB4 par l'injection de EphB2 soluble ralentit la croissance tumorale [13].

D'autres auteurs ont montré qu'un dominant négatif de EphB4 (mutation qui conduit à une protéine anormale et qui a une activité fonctionnelle dominante sur la protéine sauvage) aggrave ou même provoque une tumeur colorectale [14]. EphB2 et EphB4 sont inactifs dans beaucoup de cellules malignes, alors que ces protéines sont fortement exprimées dans les tumeurs bénignes des mêmes organes, confirmant un rôle inhibiteur tumoral du système Ephrin. On s'accorde en général pour admettre que la signalisation de EphB dans les cellules tumorales inhibe les mécanismes oncogéniques en augmentant la répulsion entre les cellules tumorales exprimant EphB et les cellules saines exprimant EphrinB1. Il est également possible que les voies de signalisation des éphrines réduisent l'invasion tumorale en augmentant l'adhérence de ces cellules à la tumeur et limitent ainsi l'infiltration locale et la dissémination des cellules malades.

Les choses ne sont malheureusement pas aussi tranchées : d'autres études suggèrent que le couple EphrinB2/EphB4 accélère la croissance tumorale et la prolifération des métastases (prostate, vessie, colorectal et mélanome) [2].

La complexité des interactions Eph/Ephrin dans les tumeurs étudiées dans des conditions et des modèles différents entraîne une certaine confusion. Il semble pourtant que les études les plus crédibles montrent que la signalisation de EphrinB2 active l'angiogenèse dans la vascularisation tumorale, comme elle le fait sur le vaisseau normal. On peut en particulier remarquer que les souris déficientes en EphrinB2 présentent une angiogenèse tumorale notablement diminuée [7].

## Implications thérapeutiques et conclusions

Il est établi et généralement admis que la signalisation de EphrinB2 joue un rôle critique dans l'angiogenèse pathologique en activant le bourgeonnement endothélial induit par le VEGF et en facilitant sa stabilisation par l'orchestration de l'assemblage des cellules endothéliales et des péricytes. Pour ces raisons, EphrinB2 et ses ligands sont des cibles intéressantes pour les thérapies anti-angiogéniques. Cependant, il faut garder en mémoire que la voie des Ephrins intervient aussi dans le métabolisme des cellules tumorales, au moins de certaines d'entre elles. Les effets résultants peuvent être très différents, voire contradictoires selon les tumeurs.

Cependant plusieurs séries de résultats permettent d'être raisonnablement optimiste :

- une forme soluble du domaine extracel-

- lulaire de EphB4 qui inhibe la signalisation d'aval de EphB4 et la signalisation d'amont de EphrinB2 réduit l'angiogenèse *in vivo* dans des modèles de tumeur ;

- des anticorps dirigés contre EphB4 bloquent les effets de EphrinB2 et, associés à l'auristatine, bloquent la progression tumorale dans le cancer colorectal [15].

## Conclusion

Il est clair que les différentes isoformes de Ephrin/Eph ont un rôle important dans l'angiogenèse normale et pathologique. Il est possible que le blocage pharmacologique du système Ephrin/Eph puisse ouvrir des voies thérapeutiques intéressantes dans le domaine de l'anti-angiogenèse tumorale. Plusieurs groupes ont rapporté des résultats prometteurs qui démontrent une anti-angiogenèse très efficace dans plusieurs modèles de tumeurs. Cependant, on ne comprend pas tout des effets des couples Ephrins/Ephs en raison de leurs interactions avec d'autres voies de signalisation dans les cellules tumorales. Cette particularité explique probablement les résultats différents et parfois contradictoires selon le type de tumeur étudié.

Nous n'en sommes donc pas à la fin de l'histoire et de nombreuses études devront encore préciser les effets de Eph/Ephrin sur l'angiogenèse en oncologie.

**Liens d'intérêts :** L'auteur déclare ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Egea J, et al. *Trends Cell Biol* 2007 ; 17 : 230-8.
2. Pasquale EB. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 165-80.
3. Pitulescu ME, et al. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 2480-92.
4. Salvucci O, et al. *Adv Cancer Res* 2012 ; 114 : 21-57.
5. Maekawa H, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003 ; 23 : 2008-14.
6. Huynh-Do U, et al. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 3073-81.
7. Sawamiphak S, et al. *Nature* 2010 ; 465 : 487-91.
8. Zhuang G, et al. *Cancer Res* 2010 ; 70 : 299-308.
9. Wang Y, et al. *Nature* 2010 ; 465 : 483-6.
10. Abéngozar MA, et al. *Blood* 2012 ; 119 : 4565-76.
11. Foo SS, et al. *Cell* 2006 ; 124 : 161-73.
12. Chung AS, et al. *Nat Rev Cancer* 2011 ; 10 : 505-14.
13. Noren NK, et al. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 3994-7.
14. Dopeso H, et al. *Cancer Res* 2009 ; 69 : 7430-8.
15. Xu Z, et al. *Expert Opin Ther Pat* 2009 ; 19 : 1035-7.