

Rôle du récepteur ALK1, membre de la famille des récepteurs du TGF- β , dans l'angiogenèse

Nicolas Ricard, Sabine Bailly
Inserm U1036, CEA Grenoble
[<sbailly@cea.fr>](mailto:sbailly@cea.fr)

ALK1 (*Activin receptor-Like Kinase 1*) est un récepteur de la famille des récepteurs du TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*). Le TGF- β est le membre fondateur d'une famille de cytokines composée de 37 membres identifiés chez l'homme. Cette famille comprend notamment les différentes isoformes du TGF- β (1-3), les BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) et les GDF (*Growth and Differentiation Factors*). Les membres de cette famille jouent un rôle crucial dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus adultes.

Bien que la plupart des récepteurs de cette famille soient ubiquitaires, ALK1 est principalement exprimé à la surface des cellules endothéliales sanguines et lymphatiques, ce qui suggère un rôle particulier pour ALK1 dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse. ALK1 a longtemps été un récepteur orphelin. En 2002, il a été proposé que le TGF- β puisse être dans certaines conditions un ligand d'ALK1 [1]. Cinq années plus tard, notre équipe a identifié deux autres membres de la famille du TGF- β capables de se lier avec ALK1 avec une haute affinité, les facteurs BMP9 et BMP10 [2]. Nous avons également mis en évidence que cette transduction du signal se faisait en présence des récepteurs BMPR2 (*BMP Receptor 2*) ou ActR2A (*Activin Receptor 2*). Cette revue synthétise les dernières découvertes concernant le rôle du récepteur ALK1 dans l'angiogenèse.

La voie de signalisation du TGF- β et des BMP

Structure des récepteurs et sites d'expression

ALK1 est un récepteur à activité sérine/thréonine kinase qui appartient à la famille des récepteurs de type 1 de la famille du TGF- β . Au sein de la famille de

récepteurs du TGF- β , trois types ont été décrits chez les mammifères : les récepteurs de type 1 (il en existe sept, appelés également ALK pour *Activin receptor-Like Kinase*), les récepteurs de type 2 (il en existe cinq) et deux récepteurs de type 3. Les combinaisons d'expression des différents récepteurs gouvernent la spécificité des ligands de la famille TGF- β /BMP et les voies de signalisation activées par ceux-ci [3].

Les récepteurs de types 1 et 2 sont des glycoprotéines transmembranaires qui possèdent une activité sérine/thréonine kinase. Le domaine extracellulaire est N-glycosylé et contient au moins 10 cystéines qui déterminent la structure de ce domaine. Trois de ces cystéines forment une région caractéristique des récepteurs de cette famille appelée « boîte à cystéines » et se trouvent près du domaine transmembranaire. La région transmembranaire est unique et ne présente pas de particularité remarquable. Enfin, le domaine intracellulaire peut se décomposer en trois sous-domaines : la boîte GS, le domaine kinase, et la queue cytoplasmique. La boîte GS est une caractéristique des récepteurs de type 1, localisée juste avant le domaine kinase. C'est un domaine de 30 acides aminés très conservé. Cette région tient son nom de sa séquence (SGSGSG) et contient les sites de phosphorylation du récepteur de type 1 par le récepteur de type 2. Le domaine kinase possède une séquence consensus des sérine/thréonine kinases. La queue cytoplasmique en C-terminal du domaine kinase est relativement courte pour les récepteurs de type 1 par rapport aux récepteurs de type 2. Les ligands de la famille TGF- β se lient à un complexe hétérotétramérique composé de deux récepteurs de type 1 et de deux récepteurs de type 2 (figure 1A).

Les récepteurs de type 3 sont dépourvus d'activité kinase et jouent un rôle de co-

récepteur. Deux récepteurs de type 3 ont été décrits, le β -glycan (dont l'expression est ubiquitaire) et l'endogline (qui est principalement exprimée à la surface des cellules endothéliales). L'endogline possède un long domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique sans activité kinase et se présente sous une forme dimérique (liaison covalente par un pont disulfure). L'endogline module l'affinité des ligands pour les récepteurs de type 1 et de type 2. L'endogline peut aussi être clivée par une protéase à la surface des cellules endothéliales, libérant ainsi une forme soluble antagoniste de l'activité des ligands.

Structure des ligands

Les ligands de la famille TGF- β comportent 4 domaines : un peptide signal responsable de la sécrétion du peptide, un prodomaine, un site de clivage par des protéases de type furine, et le domaine mature. Les ligands sont synthétisés sous une forme « précurseur » qui est clivée au niveau intracellulaire par les furines convertases. Le prodomaine ainsi libéré reste lié au domaine mature par des liaisons non covalentes. Cette forme complexée est la plupart du temps inactive (comme TGF- β ou BMP10) sauf pour certains facteurs (comme BMP9). Les ligands sont sécrétés sous forme dimérique (liaison covalente par un pont disulfure).

Transduction du signal

Lors de la liaison d'un ligand sur le complexe hétérotétramérique de récepteurs, les récepteurs de type 2 phosphorylent, grâce à leur activité sérine/thréonine kinase, les récepteurs de type 1 sur la boîte GS. L'activité sérine/thréonine kinase des récepteurs de type 1 se manifeste alors par la phosphorylation de médiateurs intra-

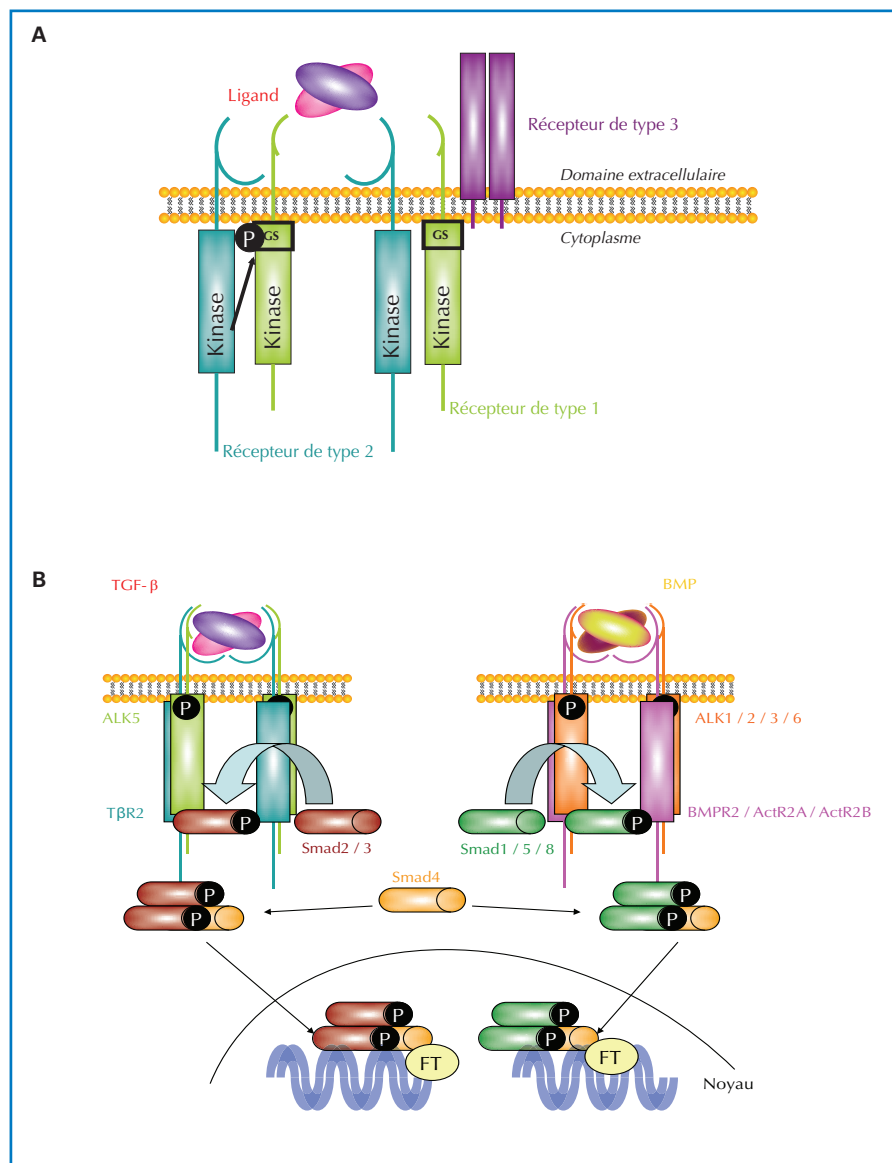


Figure 1.

A. Complexe de signalisation de la famille TGF- β .

Le ligand dimérique se lie à un hétérotétramère composé de deux récepteurs de type 1 et de deux récepteurs de type 2. Les récepteurs de type 2 phosphorylent alors les récepteurs de type 1 sur la boîte GS, activant ainsi la kinase des récepteurs de type 1. Les récepteurs de type 3 modulent la liaison du ligand sur l'hétérotétramère.

B. Les voies de la signalisation SMAD-dépendante de la famille TGF- β .

Le TGF- β se lie à un complexe T β R2/ALK5 qui aboutit à la phosphorylation de SMAD 2, 3. Les BMP induisent la phosphorylation de SMAD 1, 5, 8 lors de leur fixation sur leur complexe de réception. Les SMAD phosphorylées forment un complexe ternaire avec SMAD 4. Ce complexe est alors importé dans le noyau où il produit des réponses transcriptionnelles en s'associant à des facteurs de transcription.

P : phosphorylation,
FT : facteur de transcription.

cellulaires. La voie de signalisation cano- nique de la famille TGF- β est la voie des facteurs de transcription SMAD. Cependant, la signalisation peut aussi suivre des voies non canoniques (voies PI3K, MAPK). Les effets des membres de la famille TGF- β proviennent donc d'une régulation dyna- mique des voies SMAD et non-SMAD.

On distingue deux voies de signalisation SMAD qui vont dépendre du récepteur de type 1 activé. La voie dite des BMP (ALK1, 2, 3, 6) phosphoryle les SMAD1, 5, 8 et celle du TGF- β qui comprend également les activines (ALK4, 5, 7) phosphoryle les SMAD2 et 3. Ces SMAD phosphorylées forment un complexe trimérique avec une autre SMAD, SMAD4. Ce complexe est

alors importé dans le noyau où il s'associe avec d'autres facteurs de transcription et module l'expression de nombreux gènes en se fixant sur leurs régions promotrices (figure 1B).

Implication du récepteur ALK1, de son co-récepteur et de ses ligands dans l'angiogenèse

Découvertes à partir de maladies vasculaires humaines

La maladie du Rendu-Osler, également appelée HHT pour *Hemorrhagic Hereditary Telangiectasia*, est une maladie rare qui

se caractérise par des télangiectasies au niveau des muqueuses et de la peau, des fistules artérioveineuses dans le système nerveux central, le foie et les poumons, ainsi que des épistaxis. Les mutations d'*ENG*, codant pour l'endogline, sont responsables de la forme HHT1 ; les mutations d'*ACVRL1*, codant pour ALK1, sont responsables de la forme HHT2 [4]. Il existe aussi plus rarement des mutations de *MADH4*, codant pour SMAD4, responsable d'un syndrome associant maladie de Rendu-Osler et polypose juvénile.

Des mutations des gènes *BMPR2*, codant pour le récepteur BMPR2 α et *ACVRL1*, sont responsables de cas d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Dans cette patho-

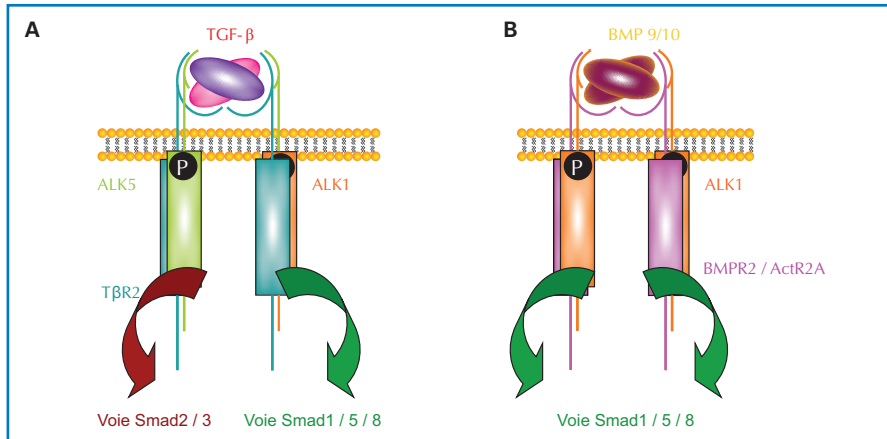


Figure 2. Modèles de signalisation pour ALK1.

A : La liaison du TGF-β sur un hétérodimère ALK1/ALK5 avec TβR2 induit les voies SMAD 2, 3 et SMAD 1, 5, 8.
B : La liaison de BMP9/BMP10 sur un homodimère d'ALK1 avec BMPR2 ou ActR2A induit la voie SMAD 1, 5, 8.

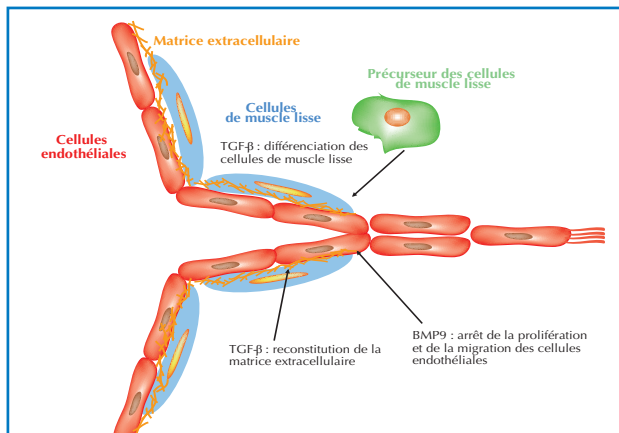


Figure 3. TGF-β et BMP9 : deux acteurs de la phase de maturation de l'angiogenèse.

lité embryonnaire précoce avant la formation du mésoderme. Les souris hétérozygotes sont normales mais développent une hypertension pulmonaire en condition de stress inflammatoire.

L'inactivation de BMP10 entraîne une létalité embryonnaire précoce due à un défaut de développement du cœur.

Les effets de l'inactivation de BMP9 n'ont pas encore été décrits.

Les ligands impliqués dans l'angiogenèse

À la suite de l'identification des récepteurs de la famille TGF-β impliqués dans l'angiogenèse, les recherches se sont focalisées sur la découverte des ligands de ces récepteurs. ALK1 a été considéré pendant longtemps comme un récepteur orphelin. Le premier modèle qui a été proposé est la liaison de TGF-β sur un complexe TβR2/ALK5/ALK1 sur les cellules endothéliales [6] (figure 2A). Cependant, les sites d'expression d'ALK1 et d'ALK5 sont apparus distincts, et les inactivations de TβR2 et d'ALK5 dans les cellules endothéliales ne donnent pas le même phénotype que l'inactivation d'ALK1. Ces découvertes remettent partiellement en cause le modèle décrit précédemment. En 2007, notre laboratoire a montré que BMP9 et BMP10 sont des ligands à haute affinité d'ALK1 [2]. Ce résultat a depuis été confirmé par plusieurs groupes. Nous avons également mis en évidence que les récepteurs de type 2 impliqués dans la transduction du signal médié par ALK1 dans les cellules endothéliales étaient BMPR2 ou ActR2A et que l'endogline agit comme co-récepteur en augmentant la réponse aux ligands BMP9 et BMP10 (figure 2B).

Effets cellulaires des membres de la famille du TGF-β impliqués dans l'angiogenèse

Effets cellulaires de l'activation d'ALK1

Dans un premier temps, en absence d'un ligand spécifique d'ALK1, plusieurs groupes ont utilisé une forme constitutivement active d'ALK1 (ALK1ca) dans les cellules endothéliales. Bien que certains résultats soient contradictoires, la plupart des études, dont celles menées par notre laboratoire, ont montré que la surexpression d'ALK1ca dans les cellules endothéliales inhibait la migration et la prolifération de ces cellules [7]. En 2005, une étude *in vivo* avec

logie, les cellules de muscles lisses prolifèrent anormalement, tandis que la survie des cellules endothéliales et leur prolifération sont altérées. Cela conduit à une occlusion des artères pulmonaires, d'où l'augmentation de la pression artérielle et la défaillance du cœur droit.

Enfin, une augmentation de la forme soluble de l'endogline a été décrite au cours de la prééclampsie. Cette pathologie se caractérise notamment par une augmentation de la pression sanguine pendant la grossesse.

Découvertes à partir de l'inactivation génique [5]

L'inactivation d'ALK1 dans le poisson zèbre et la souris conduit à une létalité embryonnaire due à des défauts de l'angiogenèse. Dans les souris, le plexus vasculaire est normal mais les vaisseaux du sac vitellin et de l'embryon ne se développent pas en un arbre vasculaire. Quelques fistules artéri-

veineuses sont visibles. L'inactivation d'ALK1 spécifiquement dans les cellules endothéliales entraîne également une létalité embryonnaire. Les vaisseaux du sac vitellin sont dilatés et tortueux et des fistules artérioveineuses sont également observées. Dans le poisson zèbre, l'inactivation de l'équivalent d'ALK1, *violet beauregarde*, aboutit à une circulation sanguine restreinte aux vaisseaux de la tête qui sont anormalement dilatés.

L'inactivation de l'endogline chez la souris donne un phénotype qui ressemble à celui de l'inactivation d'ALK1.

Les souris hétérozygotes pour ALK1 ou l'endogline développent un phénotype qui ressemble à la maladie de Rendu-Osler.

L'inactivation de TGF-β1 entraîne une létalité partielle due à un défaut de développement du sac vitellin. La vasculogenèse et l'hématopoïèse sont très affectées par cette délétion.

L'inactivation de BMPR2 entraîne une lét-



surexpression d'ALK1 dans la cornée de la souris a montré un effet inhibiteur d'ALK1 sur l'angiogenèse induite par FGF-2. Enfin, l'inactivation d'ALK1 dans le poisson zèbre augmente la prolifération endothéliale. Ces études sont en faveur d'un rôle d'ALK1 dans la phase de maturation de l'angiogenèse et dans la quiescence vasculaire.

Effets cellulaires de l'endogline

Comme pour ALK1, les résultats concernant l'effet de l'endogline sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales sont controversés. Certains décrivent que la surexpression de l'endogline aboutit à une inhibition de la migration des cellules endothéliales et d'autres à une augmentation [8, 9].

Effets cellulaires de BMP9 et BMP10

Les facteurs BMP9 et BMP10 ont été rapportés comme des ligands spécifiques et de forte affinité d'ALK1. Cependant l'expression de BMP10 semble forte au stade embryonnaire où elle jouerait un rôle dans le développement du cœur, et faible après la naissance. BMP9 par contre est produite chez l'adulte dans le foie par les hépatocytes [10] et est présente dans le sang à des concentrations biologiquement actives (5 ng/mL) [11]. Les effets de BMP9 sur les cellules endothéliales *in vitro* sont aussi sujets à controverse. Notre laboratoire a été le premier à montrer que l'addition de BMP9 *in vitro* inhibe la migration et la prolifération des cellules endothéliales [2] (figure 3). Nous avons également montré qu'*in vivo* l'addition de BMP9 inhibe l'angiogenèse induite par FGF-2 dans une éponge implantée en sous-cutané chez la souris et active le tonus vasculaire des vaisseaux de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon du poulet [11]. Depuis, d'autres groupes ont confirmé l'effet inhibiteur du BMP9 *in vivo*. Ces résultats suggèrent un rôle de BMP9 dans la phase de maturation de l'angiogenèse et dans la quiescence vasculaire, ce qui est en accord avec les résultats obtenus lors de l'étude du rôle du récepteur ALK1.

Effets cellulaires du TGF- β

Le TGF- β augmente la prolifération des cellules endothéliales à faible concentration, mais diminue leur prolifération à forte

concentration [12]. Les récepteurs impliqués dans la signalisation TGF- β (ALK5 ou ALK1) pourraient expliquer cette réponse en cloche [1]. Par contre ce qui est clairement admis est que le TGF- β par son récepteur ALK5 induit l'expression des protéines de la matrice extracellulaire et la différenciation des cellules de muscle lisse et de péricytes, recrutés par le PDGF et donc agit aussi sur la phase de maturation de l'angiogenèse (figure 3).

Inhibition de la voie ALK1 à des fins thérapeutiques

Malgré les nombreuses zones d'ombre sur le rôle d'ALK1 dans l'angiogenèse, plusieurs laboratoires pharmaceutiques développent des inhibiteurs de la voie ALK1 pour bloquer la progression tumorale. Les groupes Genentech et Acceleron Pharma développent une protéine de fusion entre le domaine extracellulaire d'ALK1 (ALK1ecd) et la partie Fc des immunoglobulines (ALK1ecd-Fc). Cette forme extracellulaire d'ALK1 permet de neutraliser les ligands d'ALK1. Les premiers essais dans des modèles murins montrent que l'addition d'ALK1ecd diminue l'angiogenèse tumorale, et retarde le développement et la progression de tumeurs pancréatiques et de tumeurs mammaires [13, 14]. Le groupe Pfizer développe un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre ALK1. Ils montrent dans un modèle murin que cet anticorps diminue le développement d'une tumeur mammaire et d'un mélanome, inhibe l'angiogenèse et la lymphangiogenèse et surtout augmente l'efficacité du bevacizumab (anticorps anti-VEGF) [15]. Les deux produits précédemment cités sont actuellement en essai clinique. Enfin, une équipe de Genentech a montré que le blocage d'ALK1 altère aussi la lymphangiogenèse, ce qui pourrait ouvrir un nouveau champ d'application de ces molécules dans le traitement des cancers [16].

Conclusion

L'étude du rôle de la famille TGF- β dans l'angiogenèse a connu des avancées significatives ces dernières années. L'inactivation de récepteurs chez la souris et le poisson zèbre ont permis de mettre à jour l'importance capitale du récepteur ALK1

et de l'endogline dans l'angiogenèse. Plus récemment, l'identification du ligand spécifique d'ALK1 a également été une avancée majeure dans la compréhension du rôle de ce récepteur dans l'angiogenèse. Bien que le rôle cellulaire d'ALK1 et de ses ligands ne soit pas encore complètement établi, la majorité des données biologiques sont en faveur d'un rôle d'ALK1 dans la phase de maturation de l'angiogenèse. En accord avec cette hypothèse, une amélioration des épistaxis des patients atteints de la maladie de Rendu-Osler par un traitement qui bloque le VEGF a récemment été décrite, ce qui suggère que la maladie est en partie due à l'activation de l'angiogenèse. Enfin, bien que le mécanisme d'action du blocage d'ALK1 soit encore inconnu, des effets thérapeutiques bénéfiques sont observés avec les inhibiteurs de la voie ALK1 dans des modèles précliniques. La compréhension précise des mécanismes de régulation de l'angiogenèse par cette famille constitue donc un défi important pour la communauté scientifique.

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Goumans MJ, et al. *Embo J* 2002 ; 21 : 1743-53.
2. David L, et al. *Blood* 2007 ; 109 : 1953-961.
3. Bragdon B, et al. *Cell Signal* 2011 ; 23 : 609-20.
4. Dupuis-Girod S, et al. *J Thromb Haemost* 2010 ; 8 : 1447-56.
5. Lowery JW, et al. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010 ; 21 : 287-98.
6. Goumans MJ, et al. *Mol Cell* 2003 ; 12 : 817-28.
7. Lamouille S, et al. *Blood* 2002 ; 100 : 4495-501.
8. Lebrin F, et al. *Embo J* 2004 ; 23 : 4018-28.
9. Lee NY, et al. *J Biol Chem* 2007 ; 282 : 21507-17.
10. Bidart M, et al. *Cell Mol Life Sci* 2011 ; Jun 28.
11. David L, et al. *Circ Res* 2008 ; 102 : 914-22.
12. Pepper MS. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997 ; 8 : 21-43.
13. Cunha SI, et al. *J Exp Med* 2010 ; 207 : 85-100, S101-105.
14. Hu-Lowe DD, et al. *Cancer Res* 2011 ; 71 : 1362-73.
15. Hu-Lowe DD, et al. *Cancer Res* 2010 ; 71 : 1362-73.
16. Niessen K, et al. *Blood* 2010 ; 115 : 1654-61.