

Table des Matières

Liste des Abréviations	7
Introduction.....	9
I. Etude de l'angiogenèse	11
A. Définitions	11
1. Angiogenèse	11
2. Vasculogenèse.....	11
B. Les cellules impliquées.....	12
1. Les cellules endothéliales	12
2. Les péricytes	12
3. Les cellules musculaires lisses.....	12
4. Etapes de la formation d'un nouveau capillaire	13
C. Modèles d'étude.....	15
1. In vitro	15
a) Cellules endothéliales en monocouche	15
b) Matrigel ou gel de collagène.....	15
c) Bourgeonnement à partir d'anneaux aortiques.....	16
d) Essai de la membrane chorioallantoïdienne (CAM assay)	16
e) Limites des essais in vitro	17
2. In vivo	17
a) Essai de la membrane chorioallantoïdienne (CAM assay)	17
b) Vascularisation cutanée.....	18
(1) Matrigel.....	18
(2) Chambre transparente intra-cutanée	18
c) Vascularisation de l'œil.....	18
(1) Cornéenne.....	18
(2) Rétinienne	19
(3) Choroïdienne	19
d) Modèles d'ischémie musculaire	19
(1) Périphérique	19
(2) Cardiaque	20

e) Modèles tumoraux	20
(1) Murins	20
(2) Xénogreffe chez la souris immunodéprimée	20
D. Méthodes d'étude	21
1. Histologie et Immunohistochimie	21
2. Mesure du flux sanguin par microsphères	21
3. Micro-angiographie	22
4. Echographie et laser doppler	22
5. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)	23
E. Stratégies d'investigation	24
1. Protéines recombinantes	24
2. Anticorps monoclonaux neutralisants	24
3. Deoxynucléotides antisens	25
4. Souris Knock Out ou transgéniques	25
5. Transfert de gène et thérapie génique	25
II. Les médiateurs de l'angiogenèse	29
A. Les facteurs de croissance	29
1. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)	29
2. FGF (Fibroblast Growth Factor)	35
3. HGF (Hepatocyte Growth Factor)	36
4. PAF (Platelet Activating Factor)	37
5. PD-ECGF/TP (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase)	39
6. PDGF (Platelet Derived Growth Factor)	39
7. Angiopoïétines	40
8. Somatostatine	40
9. Angiogénine	41
B. Les cytokines	42
1. Pro-angiogéniques	42
a) $TNF\alpha$ (Tumor Necrosis Factor- α)	42
b) Monoxyde d'azote (NO)	42
c) $TGF\beta$ (Transforming Growth Factor- β)	43

2. Anti-angiogéniques.....	44
a) Interleukines 12 et 18 (IL-12, IL-18).....	44
b) Interférons.....	44
c) TNF α (Tumor Necrosis Factor- α).....	44
d) TGF β (Transforming Growth Factor- β).....	45
C. Les chémokines.....	45
1. Pro-angiogéniques.....	46
2. Anti-angiogéniques.....	46
a) IP-10, MIG et I-TAC.....	47
b) PF4 (Platelet Factor-4).....	47
D. Les molécules d'adhésion et de structure intercellulaire.....	48
1. Les molécules d'adhésion.....	48
a) Récepteurs de la laminine.....	49
b) Récepteurs de la vitronectine.....	49
2. Le système des protéases de la matrice extracellulaire.....	50
a) Les métalloprotéinases.....	50
b) Les inhibiteurs des métalloprotéinases.....	51
c) L'angiostatine et l'endostatine.....	52
3. Les thrombospondines (TSP).....	53
III. L'angiogenèse : insuffisances et excès.....	55
A. Les anomalies de la cicatrisation.....	55
1. Physiologie de la cicatrisation.....	55
2. Anomalies liées au diabète.....	56
3. Les ulcères.....	56
B. Les anomalies du système circulatoire.....	57
1. Ischémie musculaire.....	57
a) Périphérique.....	57
b) Cardiaque.....	58
2. Athérosclérose.....	58
3. Maladies vasculaires de l'œil.....	59
a) La néovascularisation cornéenne.....	60
b) La néovascularisation de l'iris.....	60

c) Les rétinopathies	61
(1) rétinopathie de prématurité	61
(2) rétinopathie diabétique	61
d) La néovascularisation choroïdienne	63
C. Les inflammations chroniques	63
1. Polyarthrite rhumatoïde	64
2. Psoriasis.....	64
3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin	64
4. Fibrose pulmonaire idiopathique	64
D. Les tumeurs	65
1. Historique et généralités.....	65
2. Indices de vascularisation, médiateurs et pronostic	67
a) Carcinomes du poumon.....	68
b) Carcinomes du tractus gastro-intestinal	69
c) Carcinomes du tractus urogénital et carcinomes mammaires.....	69
d) Cancers hématologiques	70
e) Sarcomes.....	70
IV. Essais thérapeutiques	73
A. Difficultés méthodologiques des essais.....	73
1. Pro-angiogenèse	73
2. Anti-angiogenèse	73
B. Composés physiologiques	74
1. Pro-angiogéniques	74
a) Protéines recombinantes.....	74
b) Thérapie génique.....	74
2. Anti-angiogéniques.....	75
a) IFN γ et TNF α	75
b) IL-12.....	76
c) PF4	76
C. Inhibition des interactions et des signaux intracellulaires précoces.....	76
1. Blocage du VEGF.....	76
a) Oligodeoxynucléotides anti-sens	76
b) Anticorps monoclonaux anti-VEGF.....	77

c) Inhibiteurs des tyrosines kinases.....	77
2. Blocage du bFGF	78
a) Tecogalan sodium	78
b) Carboxyamidotriazole.....	78
3. Thalidomide.....	79
4. Blocage des intégrines.....	79
a) Vitaxine	79
b) Triflavine	80
D. Inhibition des signaux intracellulaires tardifs.....	80
1. Rétinoïdes	80
2. Bryostatin-1	80
3. Inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX)	81
4. Combretastatine A4.....	81
E. Inhibition des molécules de la matrice extra-cellulaire	82
1. Inhibiteurs des protéases	82
2. TNP-470.....	83
Conclusion.....	87
Bibliographie.....	89

Figure 1 : Vasculogenèse et Angiogenèse, mécanismes régulateurs	14
---	----

Figure 2 : Différentes voies de signalisation intracellulaire du VEGF	34
---	----

Figure 3 : Voies de signalisation cellulaire aboutissant à la production de PAF	38
---	----

Liste des Abréviations

AAV	Adenovirus Associated Viruses
ADN	Acide Desoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
DAG	Diacylglycerol
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxie Inducible Factor
HRE	Hypoxia Response Element
HSP	Heat Shock Protein
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycans
IFN	Interferon
IL	Interleukine
IMD	Intra-Tumoral Microvascular Density
IP-10	Interferon Inducible Protein -10
I-TAC	Interferon-Inducible T Cell Alpha Chemoattractant
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein – 1
MIG	Monokine Induite par l'Interféron γ
MMP	Matrix Metallo-Proteinases
NOS	Nitric Oxide Synthase
NSCLC	Carcinomes Pulmonaires Non à Petites Cellules
PAF	Platelet Activating Factor
PD-ECGF/TP	Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet-Endothelial Cell Adhesion
PF4	Platelet Factor 4
PKC	Protéine Kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PlGF	Placental Growth Factor
SCLC	Carcinomes Pulmonaires à Petites Cellules
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
uPA	Urokinase-Type Plasminogen Activator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction

Au début de l'évolution, les êtres unicellulaires trouvaient leur nourriture dans l'environnement et absorbaient les nutriments par diffusion passive ou active. En devenant plus complexes, les êtres multicellulaires sont également devenus plus épais, avec des tissus spécialisés dans des fonctions très différentes. Toutes les cellules n'étaient plus en contact avec l'extérieur et devenaient dépendantes de leurs voisines pour se nourrir et survivre : un système complexe de distribution des nutriments et de l'oxygène a été mis en œuvre pour les apporter là où ils sont nécessaires, ce système est appelé système vasculaire. Composé d'une pompe, le cœur, d'artères, de capillaires et de veines, ce système assure la distribution du sang, et donc des éléments qu'il transporte, à l'ensemble des cellules de l'organisme : il s'agit d'un réseau sillonnant les tissus, se divisant en fines artérioles puis en capillaires dont la structure permet le passage des éléments nutritifs vers les cellules avoisinantes. Les dernières étapes se font par diffusion, comme chez les êtres primitifs.

C'est à ce réseau que nous nous intéresserons ici : mis en place très précocement lors de l'embryogenèse, il ne cesse de se développer et de se remodeler durant la croissance des individus. Par contre, une fois parvenu à l'âge adulte, ce réseau est relativement peu soumis aux phénomènes de remaniement. Lorsque ces remaniements existent, ils sont la plupart du temps liés à un état pathologique : nous essaierons dans ce travail de décrire l'ensemble des mécanismes impliqués dans la sortie de l'état quiescent vers l'état activé, ainsi que leurs conséquences.

Dans un premier temps, nous décrirons les acteurs de l'angiogenèse et les moyens d'investigation qui ont été développés pour en comprendre le fonctionnement. Ensuite, nous aborderons les principales molécules de dialogue intercellulaire qui participent à la régulation du phénomène. Enfin, nous évoquerons les situations dans lesquelles un dérèglement se produit, les conséquences qui en découlent, ainsi que les interventions thérapeutiques envisageables dans ce domaine et qui sont actuellement en cours d'évaluation, pré-clinique ou clinique.

I. Etude de l'angiogenèse

Après avoir précisé la définition de l'angiogenèse, nous aborderons les cellules impliquées dans ce phénomène, les modèles d'étude et les méthodes de recherche qui ont permis de progresser dans la connaissance de son fonctionnement.

A. Définitions

1. Angiogenèse

L'angiogenèse, phénomène consistant à générer de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux pré-existants, intervient pendant le développement embryonnaire ainsi que dans de nombreux phénomènes physiologiques comme par exemple l'ovulation, ainsi que dans des phénomènes d'adaptation ou de réponse à une anomalie ou une agression : elle peut intervenir suite à une obstruction vasculaire en générant des capillaires collatéraux, dans le déroulement de l'inflammation ou dans le cadre du mécanisme de la cicatrisation...

Nous nous limiterons ici à l'étude de ce phénomène lorsqu'il est lié à un phénomène inflammatoire ou tumoral en le désignant sous la terme de néoangiogenèse.

L'activité des cellules endothéliales, principales actrices de ce phénomène, est régulée par un système complexe de médiateurs, pro ou anti-angiogéniques, que nous décrirons un peu plus tard.

2. Vasculogenèse

La vasculogenèse consiste en la différenciation in situ de précurseurs des cellules endothéliales, les angioblastes, et leur association pour former les premiers vaisseaux sanguins. Principalement observé au cours de l'embryogenèse, ce phénomène a également été décrit à l'âge adulte. Les angioblastes circulants, issus de la moelle osseuse, sont capables de s'insérer aux sites d'angiogenèse tumoraux ou au niveau des vaisseaux collatéraux induits suite au phénomène ischémique. Ils peuvent être isolés à partir de la moelle osseuse et amplifiés in vitro grâce au GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor), d'où leur possible utilisation en thérapie génique.

B. Les cellules impliquées

1. Les cellules endothéliales

Ce sont des cellules aplaties qui forment un réseau continu ou discontinu, et s'organisent en tubules que l'on appelle capillaires sanguins. L'origine supposée des cellules responsables du phénomène de néoangiogenèse a varié au cours du temps : issues des vaisseaux préexistants dans un premier temps, on ne peut actuellement négliger l'existence de cellules précurseurs circulantes, les angioblastes.

Dans les organes adultes, le renouvellement des cellules endothéliales est un phénomène extrêmement lent. Ces cellules se réactivent sous l'action de certains signaux, puis, dans les situations physiologiques, retournent à un état quiescent. Dans l'angiogenèse dite "pathologique", il existe un dérèglement de la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques et on assiste à leur multiplication anarchique.

2. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules primitives, communément considérées comme le dernier vestige des cellules embryonnaires mésenchymateuses à l'âge adulte. Ce sont des cellules étroitement accolées aux cellules endothéliales des capillaires, avec lesquelles elles partagent leur membrane basale. Essentiellement présentes au niveau des capillaires, on en retrouve quelques unes dans la tunique adventice des artères ou des veines de petit diamètre. Il a été suggéré que ces cellules puissent se transformer en fibroblastes ou en cellules musculaires lisses.

3. Les cellules musculaires lisses

Les vaisseaux matures de plus gros diamètre (au niveau artériel et veineux) sont entourés de cellules musculaires lisses qui sont très importantes pour assurer le soutien des cellules endothéliales. Ces cellules assurent également la vasomotricité et donc la régulation du flux sanguin parvenant aux tissus. De par leur capacité à produire un certain nombre de médiateurs, les cellules musculaires lisses participent activement à l'angiogenèse.

Il faut noter que certains vaisseaux, en particulier les vaisseaux tumoraux, sont fréquemment dépourvus de ces cellules, ce qui évoque une dysrégulation au niveau du remodelage vasculaire.

4. Etapes de la formation d'un nouveau capillaire

L'initiation du phénomène d'angiogenèse nécessite une modification du phénotype des cellules endothéliales sous l'effet d'une stimulation. Celle-ci peut être physiologique, comme l'hypoxie qui entraîne la sécrétion d'un facteur mitogénique puissant appelé VEGF (vascular endothelial growth factor), ou inflammatoire après une lésion ou une infection, ou encore associée à la présence d'une tumeur invasive. L'hypoxie est souvent le stimulus initial qui enclenche la production d'une cascade de médiateurs pro et anti-angiogéniques, mais il existe également des cas où l'hypoxie est faible et la vascularisation importante.

La formation d'un nouveau vaisseau se décompose en plusieurs phases : les étapes initiales comprennent la vasodilatation du vaisseau parental ce qui réduit la cohésion entre cellules endothéliales adjacentes, la dégradation de la membrane basale et du conjonctif adjacent par des protéases de type métalloprotéinases MMP-2 et MMP-9 ainsi que par les activateurs du plasminogène. Les vaisseaux sont ensuite déstabilisés sous l'action de l'angiopoïétine-2, ligand du récepteur Tie-2 et ainsi antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1.

Vient ensuite une phase de migration des cellules endothéliales, de prolifération, d'élongation et de mitose puis celle d'assemblage en tubules pour parvenir au bourgeonnement du capillaire. La dernière étape consiste en la stabilisation des vaisseaux pendant ce qu'on appelle la phase de maturation : il s'agit du recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses, ainsi que la formation d'une nouvelle membrane basale, processus impliquant le platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), l'angiopoïétine-1 et le Transforming Growth Factor- β (TGF β). Certains vaisseaux, une minorité, vont encore évoluer en augmentant leur diamètre et l'épaisseur de leur paroi. A ce stade, ils sont encore très dépendant de la présence de facteurs comme le VEGF : le réseau peut encore régresser complètement en son absence. Si le vaisseau ne régresse pas, il s'implante définitivement et la machinerie de l'angiogenèse s'éteint. Les expériences de Gerber et coll. montrent effectivement que le VEGF n'est plus nécessaire à la survie des individus adultes alors qu'il est encore strictement indispensable chez le nouveau-né et jusqu'à 4 semaines de vie [69].

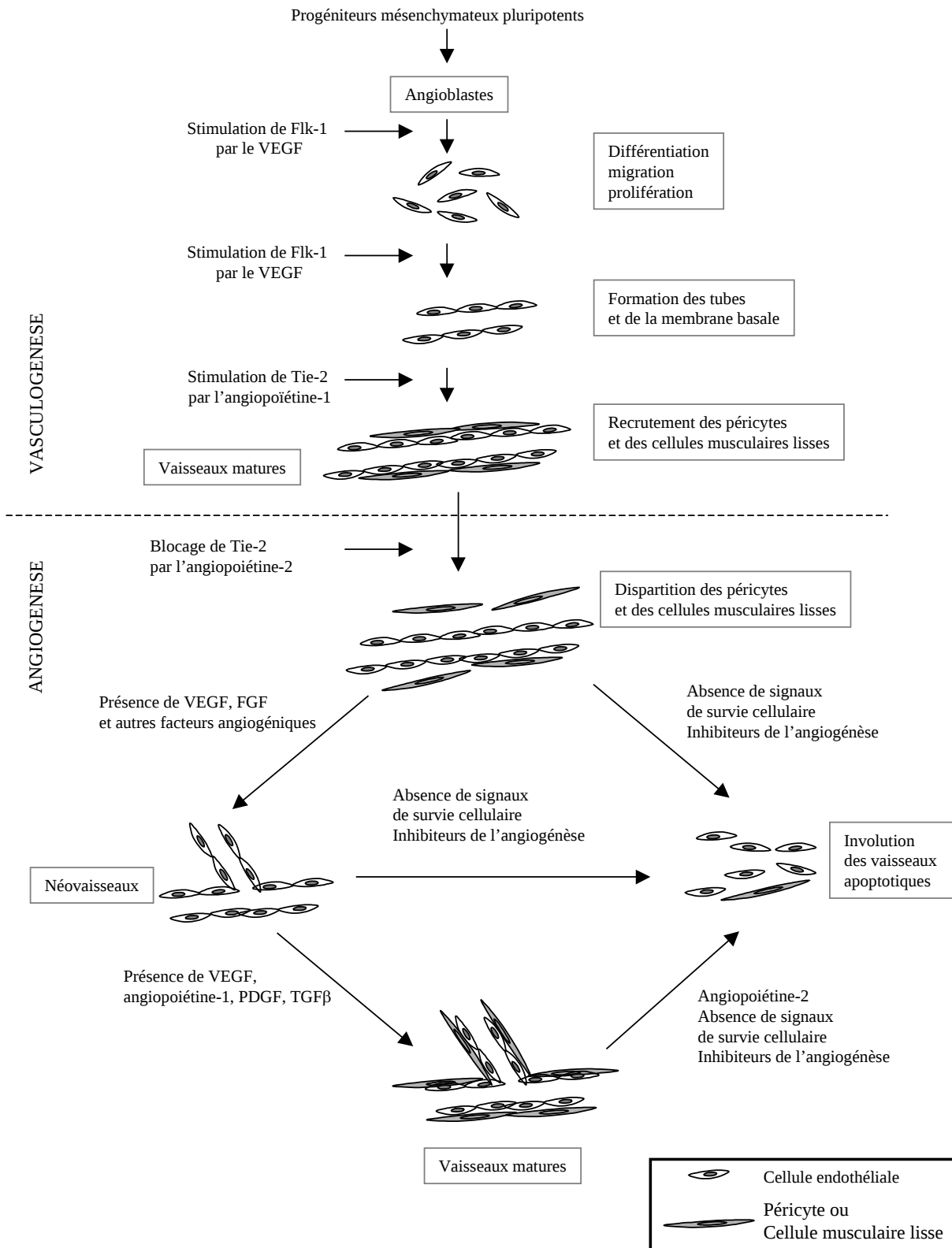


Figure 1 : **Vasculogenèse et Angiogenèse, mécanismes régulateurs** (d'après Li et coll. [110])

C. Modèles d'étude

L'angiogenèse est régulée par de nombreux médiateurs intercellulaires : des modèles d'étude ont été mis au point pour étudier et individualiser les effets de chacun d'entre eux, ainsi que ceux de molécules synthétiques. La culture de cellules endothéliales *in vitro* est extrêmement importante pour tester l'activité de composés sur une fonction déterminée et précise, telle que la capacité de migration, l'activité mitogénique ou la sécrétion de cytokines et autres médiateurs. L'angiogenèse *in vivo* est bien sûr beaucoup plus complexe et les effets observés *in vitro* ne sont pas toujours confirmés par les modèles *in vivo*.

1. In vitro

a) Cellules endothéliales en monocouche

Les cellules endothéliales peuvent être cultivées *in vitro* en présence de facteurs de croissance et on peut tester ainsi l'activité inductrice de la prolifération de molécules candidates. C'est un test préliminaire, simple et rapide. Il est bien entendu nécessaire de tester cette activité en parallèle sur des fibroblastes en culture afin de s'assurer de la spécificité des composés vis-à-vis des cellules endothéliales. Il est également nécessaire de tester l'activité spécifique des composés anti-angiogéniques sur la prolifération induite par un facteur de croissance donné.

L'inconvénient de cette technique est sans doute qu'elle ignore totalement d'autres étapes fondamentales du mécanisme angiogénique, telles que migration, formation de tubules, etc....

b) Matrigel ou gel de collagène

Les cellules endothéliales sont isolées à partir de prélèvements sur l'animal ou sur l'homme. Elles sont placées sur un gel de collagène dans du milieu de culture contenant 10% de sérum de veau fœtal. Une fois parvenues à confluence, le milieu est appauvri en sérum, ce qui rend la présence de facteurs de croissance indispensable. Le comportement des cellules est observé après 72 heures de culture. En présence des facteurs adéquats, les cellules vont évoluer vers la formation de tubules, dénombrables au microscope. Toutefois, on remarque une grande hétérogénéité dans les résultats en fonction de la nature du collagène utilisé.

c) Bourgeonnement à partir d'anneaux aortiques

Des aortes de souris sont disséquées, puis découpées et déposées sur un support nutritif : des néovaisseaux se forment alors à la périphérie de la coupe suite à la migration des cellules endothéliales, proportionnellement, en nombre et en longueur, à l'intensité du stimulus appliqué [135]. Il s'agit d'un essai en trois dimensions qui permet de tester des interactions plus complexes : il a l'avantage de prendre en compte des signaux provenant des cellules non-endothéliales, comme des cellules musculaires lisses par exemple. Toutefois la quantification se révèle difficile, les besoins de croissance varient entre l'explant et les cellules en migration et il est très complexe de réaliser la culture en l'absence de sérum.

Pour pallier ces inconvénients, l'utilisation d'aortes embryonnaires a été développée, notamment en raison du fait que ces cultures fonctionnent bien en l'absence de sérum et que le phénotype des cellules endothéliales y est plus proche de ce que l'on retrouve dans la microvascularisation des réactions angiogéniques pathologiques que lorsqu'on utilise des aortes d'individus adultes [10].

d) Essai de la membrane chorioallantoïdienne (CAM assay)

Les embryons de poulet sont prélevés après 72 heures d'incubation et maintenus in vitro pendant 8-12 jours. La membrane chorioallantoïdienne est une structure embryologique externe qui se développe 2 à 3 jours après le prélèvement de l'embryon. Une fois dénudée, on peut placer le composé à tester à la surface de la membrane et observer l'inhibition de la croissance des vaisseaux en 48 heures environ. Cet essai prend en compte une beaucoup plus large part du processus angiogénique, de la prolifération des cellules à la dégradation de la matrice extracellulaire, et il a l'avantage de permettre un suivi en continu du processus angiogénique.

Toutefois, la membrane chorioallantoïdienne est elle-même une structure dont la vascularisation est croissante, ce qui peut parfois masquer l'effet de certaines molécules. De plus, si la molécule à tester possède des propriétés vasodilatatrices, on risque d'observer des résultats faussement positifs, tout simplement parce que des vaisseaux de faible diamètre, invisibles au microscope, vont se dilater et donc devenir visibles, ceci sans qu'il y ait aucune croissance de néovaisseau. Il arrive également d'observer des faux négatifs, comme, par exemple, les produits induisant un œdème qui apparaissent quasi systématiquement antiangiogéniques.

e) Limites des essais in vitro

La pharmacocinétique est ignorée dans ce type d'essai, qu'il s'agisse de la dégradation des produits pendant la durée de l'incubation (48 à 72 heures), ou de la métabolisation possible in vivo qui peut tout aussi bien désactiver qu'activer la molécule. Il faut dans tous les cas se méfier des effets non-spécifiques des composés, des faux négatifs dus à un défaut de solubilité et des faux positifs liés, par exemple, à des produits irritants qui induisent une vascularisation secondaire à l'inflammation.

Une des difficultés majeures pour la culture in vitro réside dans l'obtention d'un nombre suffisant de cellules primaires. De ce fait, la plupart des tests utilisent des cellules multipliées in vitro, ce qui expose à des altérations dans le stade d'activation (en état de multiplication au lieu du stade quiescent observé in vivo), le caryotype, l'expression d'antigènes de surface et les capacités de croissance de ces cellules.

L'angiogenèse est principalement un phénomène survenant au niveau de la microvascularisation, or les modèles in vitro utilisent des cellules dérivées des gros vaisseaux. Ceci pose le problème de l'extrapolation des résultats obtenus. De plus la nature de ces vaisseaux implique également une forte hétérogénéité d'où des résultats parfois difficilement interprétables : en effet, toutes les cellules endothéliales ne sont pas identiques et leur capacité de réponse à différents facteurs de croissance ou d'inhibiteurs varie suivant les organes qui en sont sources. Par exemple, les cellules endothéliales tumorales augmentent fortement l'expression de leur molécules d'adhésion et autres intégrines, de même les cellules endothéliales du cerveau ont une morphologie et un profil enzymatique caractéristiques [10].

2. In vivo

a) Essai de la membrane chorioallantoïdienne (CAM assay)

Cet essai peut également être pratiqué in ovo, ce qui est plus simple techniquement que la culture de tissus in vitro, mais qui présente le désavantage d'être plus difficile à quantifier. Les œufs sont pré-incubés 72h, une ouverture est pratiquée dans la coquille et la membrane coquillière, une greffe de cellules ou d'éponge imbibée de composé est ensuite déposée sur la membrane chorioallantoïdienne. L'ouverture de la coquille doit se faire avec beaucoup de précautions pour ne pas provoquer d'irritation de la membrane. L'ouverture doit ensuite être bouchée jusqu'à la fin de l'expérience, ce qui empêche de réaliser un suivi dans le temps : en

effet, la membrane est extrêmement sensible aux variations de tension partielle en oxygène, la réouverture séquentielle est donc une source de biais important pour l'évaluation finale.

b) Vascularisation cutanée

(1) Matrigel

Le matrigel est un matériau riche en laminine qui a la propriété d'être liquide à 4°C et semi-solide à 37°C. Il peut donc servir de support pour des cellules ou des composés qui sont mélangés au liquide, lui-même est injecté en sous-cutané aux animaux et il se gélifie in situ. La mesure de l'action angiogénique des composés se fait par l'évaluation de l'extension des vaisseaux à travers le matrigel ou par la mesure de l'hémoglobine totale contenue dans le bloc [143]. Comme le matrigel est un matériau avasculaire, il n'existe pas de bruit de fond. Dans la pratique, il existe une variabilité considérable dans ce test, principalement due à la difficulté de générer des blocs identiques en trois dimensions, même si le volume injecté est constant. L'analyse histologique est longue et la numération des vaisseaux sanguins est difficile. La quantification de l'hémoglobine ne permet pas de différencier les capillaires et les gros vaisseaux.

(2) Chambre transparente intra-cutanée

C'est une technique historique de mesure de l'angiogenèse in vivo [4]. Elle consiste à implanter une chambre transparente contenant des cellules ou des composés adsorbés sur des éponges au niveau de la peau : ceci permet de visualiser la cinétique de croissance des microvaisseaux, car elle permet des observations microscopiques in situ. Elle est également adaptée à la mesure des événements hémodynamiques comme la perturbation de la pression artérielle. La pose de la chambre est toutefois difficile et la procédure chirurgicale a des répercussions sur la vascularisation, parfois non-négligeables comparées au phénomène étudié [203]. De nombreuses adaptations de cette technique ont été décrites.

c) Vascularisation de l'œil

(1) Cornéenne

La cornée est un tissu transparent et avasculaire à l'état physiologique. La vascularisation peut être suivie au cours du temps sans sacrifice des animaux comme pour le matrigel : les vaisseaux apparaissent au niveau du limbe et progressent en direction du centre de la cornée. Il est donc relativement facile de dénombrer et de mesurer longueur et diamètre des

néovaisseaux. Un composé angiogénique est injecté sous anesthésie dans le stroma, entre les membranes interne et externe de la cornée et face à la pupille. On peut également introduire un tampon (éthylène-vinyl-acétate ou hydron) imbibé de composé pour lequel la libération sera ainsi prolongée, ou même effectuer des greffes tumorales. L'inconvénient de ce modèle est la régression spontanée des vaisseaux qui intervient entre 8 et 12 jours selon l'espèce, notamment une fois que la molécule pro-angiogénique utilisée pour induire la vascularisation est épuisée. Cette régression empêche de généraliser à des modèles tumoraux par exemple où il n'existe pas de régression spontanée.

(2) Rétinienne

Il s'agit d'un modèle de néovascularisation rétinienne liée à l'exposition de l'animal nouveau-né à l'oxygène (>98%) [72]. Cette exposition entraîne l'oblitération des vaisseaux postérieurs de la rétine. Les animaux sont ensuite placés dans un environnement normoxique ce qui va entraîner une hypoxie dans la rétine à présent sous-vascularisée, d'où l'induction d'une néovascularisation. La meilleure reproductibilité dans ce modèle a été obtenue lorsque les animaux sont gardés 7 jours en normoxie avant l'exposition à l'hyperoxie [175]. La quantification peut toutefois se révéler difficile.

(3) Choroïdienne

La vascularisation choroïdienne expérimentale est obtenue par une méthode de photocoagulation au laser au krypton entraînant une destruction par brûlure de la membrane de Bruch [187].

d) Modèles d'ischémie musculaire

(1) Périphérique

Les animaux sont anesthésiés, l'artère fémorale est isolée et ligaturée en 2 points. En ce qui concerne les lapins, on peut être amené à les revêtir d'une protection destinée à empêcher l'automutilation.

Suite à l'obstruction de l'artère constituant la vascularisation principale des membres, on assiste à la prolifération in situ de connections préexistantes en véritables artères collatérales via un processus appelé artériogénèse. Dans le modèle d'ischémie chirurgicale, on observe la coexistence de ce phénomène, localisé à la partie proximale du réseau, et du phénomène d'angiogénèse, plus localisé au niveau des muscles. Le maximum de prolifération est observé

la première semaine suivant l'occlusion de l'artère fémorale, suggérant la libération quasi immédiate des facteurs de croissance [9]. En effet, immédiatement après l'occlusion, les monocytes libèrent différents facteurs, dont le Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) et le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [12].

(2) Cardiaque

L'occlusion de l'artère coronaire circonflexe est rendue possible par l'utilisation d'un constricteur améroïde : ce matériel permet d'induire une ischémie progressive à mesure que l'anneau se gonfle. L'occlusion est totale en une dizaine de jours. Ce procédé permet le développement progressif des vaisseaux collatéraux [14]. A l'état physiologique, c'est à dire en l'absence de traitement, le flux sanguin est suffisant pour assurer la fonction cardiaque au repos, par contre le myocarde est hypoxique lorsque la demande en oxygène augmente (exercice physique).

e) Modèles tumoraux

(1) Murins

Il existe de nombreux modèles de tumeurs murines. Les cellules sont cultivées in vitro et injectées à des souris de même fond génétique : les souris sont alors généralement incapables de reconnaître la tumeur injectée comme leur étant étrangère puisqu'elle est génétiquement identique. Certaines de ces tumeurs étaient spontanées à l'origine, d'autres ont été induites par des mutagènes.

Il existe des tumeurs spécifiques des cellules endothéliales, ce qui est un modèle particulier dans l'étude de l'angiogenèse puisque les cibles de l'anti-angiogenèse sont à la fois les cellules des vaisseaux, mais aussi celles de la tumeur elle-même. Le cas des cellules EOMA (hémangioendothéliome murin) en est un exemple typique.

(2) Xénogreffe chez la souris immunodéprimée

La souris nude est une souris athymique et dépourvue de poils. L'absence de thymus a pour conséquence une absence de maturation des cellules T, d'où un déficit immunitaire cellulaire marqué. La souris SCID (Déficit Immunitaire Combiné Sévère) porte quant à elle une mutation dans le gène rag, d'où une incapacité de recombinaison somatique et l'absence de maturation à la fois des cellules effectrices de l'immunité cellulaire et humorale adaptative.

On recourt parfois à l'irradiation (non-létale) de ces souris pour supprimer toute immunité résiduelle.

De part leur déficit immunitaire important, ces souris sont incapables de rejeter des greffes tumorales, même provenant d'une autre espèce : des tumeurs humaines peuvent donc être implantées chez ces souris, soit à partir de cellules cultivées in vitro, soit directement à partir de fragments prélevés lors de biopsie ou d'exérèse chirurgicale d'une tumeur chez un patient.

D. Méthodes d'étude

1. Histologie et Immunohistochimie

La procédure pour dénombrer le nombre de vaisseaux sur une coupe histologique est la suivante : le fragment tumoral est inclus dans un bloc de paraffine ou congelé. Plusieurs coupes sont colorées en hématoxyline-éosine et une région représentative de la tumeur est choisie. Des coupes additionnelles de 5µm d'épaisseur sont réalisées à proximité de cette région afin d'être révélées en immunohistochimie. Plusieurs marqueurs des cellules endothéliales peuvent être utilisés : chez l'homme, on utilise le Facteur de Von Villebrand (ou antigène du facteur VIII), l'anti-CD31 (anti-PECAM ou encore Anti-Platelet-Endothelial Cell Adhesion), l'anti-CD34, l'anti-collagène de type IV (marquant plus précisément la membrane basale), l'anti-vimentine ; chez la souris, on peut aussi utiliser de l'anti-PECAM, l'anti-actine lisse (qui marque les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux). Tous ces marquages doivent être corroborés par l'examen morphologique.

Les tumeurs sont très rarement vascularisées de façon uniforme : il existe ce que l'on appelle des "hot spot", c'est à dire des régions très fortement vascularisées. Ce sont ces régions qui doivent être examinées et au niveau desquelles s'effectue le dénombrement des vaisseaux. Plusieurs champs du microscope doivent être dénombrés de la même façon. On peut remarquer que la distribution de la vascularisation est différente dans les sarcomes et les carcinomes : homogène dans les sarcomes, elle est davantage localisée en foyers dans les carcinomes.

2. Mesure du flux sanguin par microsphères

Des microbilles de polystyrène (15 µm de diamètre), colorées ou radio-marquées, sont injectées dans l'atrium ou le ventricule gauches des animaux. Après stabilisation, les animaux

sont sacrifiés et le nombre de billes présentes dans les zones ischémiques et non ischémiques des muscles est mesuré : de par leur taille, les billes sont incapables de franchir le réseau capillaire et restent donc bloquées dans les tissus. Leur nombre à un endroit donné reflète l'intensité du flux sanguin dans ce tissu [14].

3. Micro-angiographie

Un produit de contraste radio-opaque à base d'iode est injecté par cathéter intraveineux. Des clichés radiographiques sont ensuite réalisés. Le produit apparaît en blanc sur les radiographies. Chez la souris, cette technique est utilisée pour mesurer par exemple la vascularisation des membres ou celle de tumeurs grâce à l'injection du produit de contraste dans l'aorte dorsale.

L'angiographie permet la visualisation de la morphologie des vaisseaux, allant des variations de calibre aux ondulations et sinusoides. L'utilisation de l'angiographie en clinique est limitée à quelques cas d'interventions chirurgicales à cause du caractère fortement invasif de cette technique.

4. Echographie et laser doppler

Cette technique permet de mesurer la présence d'un flux dans les vaisseaux, sa vitesse et la résistance intra-vasculaire (qui reflète la pression interstitielle). Des ultrasons sont envoyés par la sonde échographique vers les tissus et, suivant la densité de ces tissus, ils sont réfléchis vers la sonde qui les capte, les analyse et reconstruit le plan de coupe sous forme d'image en 2 dimensions. Lorsque les ultrasons percutent un corps en mouvement, ici les cellules sanguines, ils sont réfléchis mais leur longueur d'onde est modifiée. L'appareil est capable d'interpréter ces variations et d'en déduire la vitesse des éléments en mouvement : cette vitesse est visualisée par un dégradé de couleur sur l'écran.

Cette technique, peu invasive, ne permet quasiment pas en revanche d'explorer la morphologie des vaisseaux. De plus, lorsque le flux est trop lent, la sensibilité de la technique est insuffisante ce qui limite la détection des capillaires sanguins. Il existe toutefois des produits de contraste échographiques qui diminuent le seuil de sensibilité de la technique : l'air est un élément qui ne laisse pas passer les ultrasons et ces produits de contraste sont donc constitués de minuscules bulles d'air qui sont injectées en IV [106].

L'étude de la pulsatilité et de la résistance vasculaire est possible par cette technique, toutefois, Delorme et Knopp rapportent que ces mesures dans le cancer du sein n'apportent pas de bénéfice pour le diagnostic [54]. Pour le diagnostic des mélanomes, une relation a été démontrée entre la vascularisation visualisée par échographie-doppler et l'indice de pronostic histologique de Breslow, d'où la possibilité de planifier la chirurgie pour éviter une deuxième intervention de curage péri-tumoral [107].

Le laser doppler est une technique similaire, mais c'est un faisceau laser qui remplace les ultrasons. La résolution en surface est beaucoup plus fine mais ne concerne que quelques dixièmes de millimètre en profondeur.

5. Imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

L'IRM consiste à mesurer point par point un signal physique dont l'intensité varie avec différents paramètres tissulaires. L'intensité du signal, issu de l'aimantation nucléaire des noyaux d'hydrogène, dépend en particulier de la quantité d'eau présente dans les tissus et de son organisation physico-chimique. Le contraste observé sur une image est la traduction visuelle des différences relatives d'intensité de signaux entre les différents points de l'image [108]. Les vaisseaux d'un diamètre d'environ 4 mm peuvent être visualisés.

Une capacité d'acquisition des images suffisamment rapide donne accès à des études dynamiques des modifications du contraste après l'administration d'un traceur qui va, en fonction de sa nature, diffuser différemment dans l'organisme. Les produits de contraste à base de gadolinium ont des effets paramagnétiques : ces effets se traduisent par une diminution du signal RMN (diminution due à des déphasages entre les signaux élémentaires) aux interfaces entre milieux d'aimantation différentes. Lorsque le produit reste dans le compartiment vasculaire, on observe la diminution du signal aux interfaces vaisseaux-tissus. La diminution du signal observé dans un volume donné dépend de la concentration de produit dans le vaisseau, mais est aussi proportionnelle à la densité vasculaire. Il existe des produits de contraste qui diffusent dans le milieu extra-cellulaire, entraînant de ce fait une augmentation du contraste du parenchyme : le parenchyme des tumeurs malignes augmente de contraste plus rapidement que les tissus adjacents dû à l'augmentation de perméabilité de leurs vaisseaux. Une acquisition rapide et séquentielle des images permet de visualiser la cinétique de la prise de contraste et donc d'avoir des précisions sur les caractéristiques tumorales [54].

Une technique particulière, l'IRM-GRE pour "gradient recalled echo" [180], permet de visualiser l'augmentation du flux sanguin dans le tissu d'intérêt et donc la capacité de vasodilatation des vaisseaux. Les effets paramagnétiques de la déoxyhémoglobine (mais pas de l'oxyhémoglobine) créent des variations locales du champ magnétique à proximité des vaisseaux sanguins : l'interprétation se fait en comparant l'image obtenue lorsque l'animal respire de l'oxygène pur et un mélange oxygène-CO₂. Les tumeurs dont le réseau vasculaire est très développé réagissent de manière beaucoup plus importante que les autres.

L'IRM est donc une technique non-invasive permettant de quantifier l'angiogenèse tumorale et de suivre son évolution sous traitement. Elle est en pleine évolution et de nouvelles techniques sont en cours de développement.

E. Stratégies d'investigation

De façon non exhaustive, nous allons rappeler les principales stratégies utilisées en recherche fondamentale pour étudier les fonctions d'une molécule.

1. Protéines recombinantes

L'utilisation de molécules synthétiques est une approche simple qui consiste à cloner le gène d'intérêt et à synthétiser la protéine à partir de son ARN messager (Acide Ribonucléique). Le codage moléculaire est parfaitement connu et les acides aminés peuvent être assemblés selon ce code. La difficulté, pour les gènes eucaryotes, est de connaître les séquences codantes (exons) et non-codantes (introns) de la molécule. De plus, il existe des modifications post-transcriptionnelles qui peuvent parfois être essentielles à la fonction de la protéine. Une parfaite connaissance de sa structure est donc nécessaire avant de produire des molécules recombinantes. L'introduction d'un plasmide codant pour le gène d'intérêt dans des bactéries de type E. Coli ou dans des levures permet ensuite une production à grande échelle.

2. Anticorps monoclonaux neutralisants

L'immunisation d'un animal par la protéine purifiée permet de générer des anticorps polyclonaux, c'est à dire capable de reconnaître plusieurs épitopes de la protéine. La fusion des cellules B sécrétant ces anticorps avec des cellules B tumorales mais dépourvues de récepteur immunoglobuline permet d'obtenir, par sélection et dilution limite, des clones de cellules immortalisées sécrétant chacun un anticorps mono-spécifique, appelé monoclonal.

Certains anticorps sont dits "neutralisants" lorsque leur liaison à la protéine inhibe sa fonction (site actif d'une enzyme ou zone de liaison à un récepteur par exemple).

3. Deoxynucléotides antisens

Il s'agit de molécules de synthèse constituées de la réplique complémentaire de tout ou d'une partie d'un transcrit d'ARN messenger : l'assemblage avec leur complémentaire ARNm empêche ce dernier d'être traduit en protéine par la machinerie cellulaire ribosomiale, d'où l'absence de production de la protéine [176].

4. Souris Knock Out ou transgéniques

Les souris "Knock Out" (KO) sont des souris chez lesquelles le gène codant pour une protéine donnée a été éliminé du génome par recombinaison homologue, c'est à dire que l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) d'une cellule souche embryonnaire a été modifié et le gène d'intérêt excisé. La cellule souche est ensuite réintroduite dans un embryon de souris, et, si elle se localise au niveau de la lignée germinale (phénomène aléatoire), pourra donner naissance à un individu portant la délétion (2^e génération). Ceci permet principalement d'appréhender la fonction du gène pendant l'embryogenèse, et plus tardivement, si la délétion n'est pas létale. Les souris transgéniques sont au contraire des souris chez lesquelles un gène a été ajouté ou modifié, ou encore dont on a modifié le profil d'expression en changeant tout ou partie de son promoteur.

5. Transfert de gène et thérapie génique

La thérapie génique permet une expression localisée et soutenue du transgène et limite les effets indésirables systémiques. Plusieurs vecteurs existent avec chacun des avantages et des inconvénients, mais ils ont tous en commun une cassette d'expression contenant un promoteur modulateur, le transgène d'intérêt et les signaux stop appropriés pour stabiliser l'ARNm.

L'ADN peut être transféré sous forme native par l'intermédiaire d'un plasmide : l'ADN d'intérêt est simplement intégré dans une structure circulaire. Il n'existe aucune limite de taille du transgène pour cette méthode de transfert. Il existe en fait trois méthodes d'administration : la délivrance sous pression du plasmide, le "gene guns" qui est une méthode favorisant la pénétration membranaire du plasmide par l'utilisation de particules servant de support pour le plasmide, et l'incorporation à des liposomes, substances détergentes ou encore acides-aminés

lipophiles (poly-L-Lysine). Le plasmide est capté via les endosomes cellulaires, transporté vers les lysosomes et dégradé. Une faible proportion de l'ADN arrive jusqu'au noyau et se localise épichromosomalement, ce qui évite les risques d'altération du génome. L'efficacité de transfection est très faible, toutefois l'intérêt majeur réside dans son très faible pouvoir immunogène.

Au contraire, les vecteurs viraux sont très efficaces pour transférer leur matériel génétique vers le noyau des cellules infectées. Plusieurs types de virus sont utilisables pour le transfert de gènes :

- Les adénovirus sont des virus à ADN à double brin de 36 kb, entouré par une capsid protéique. Ces vecteurs peuvent transporter des transgènes de 7,5 kb. Le gène transféré reste en position épichromosomale. La réponse immunitaire contre le virus limite la durée d'expression du transgène, ce qui, dans le cas d'une thérapeutique pro-angiogénique, peut être un avantage pour éviter les risques d'angiogenèse inappropriée.
- Les rétrovirus sont des virus à ARN qui contiennent une enzyme appelée reverse transcriptase qui convertit l'ARN viral en ADN lorsque le virus est entré dans la cellule. Cet ADN est intégré de manière aléatoire au génome de l'hôte lors de la réplication cellulaire (phénomène rare chez les cellules différenciées comme les cellules myocardiques). L'intégration au génome pose plusieurs problèmes : l'expression du transgène pendant toute la durée de vie de la cellule hôte, et le risque de mutagenèse. Ces problèmes limitent pour l'instant l'utilisation des vecteurs rétroviraux aux seuls modèles animaux.
- Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont en fait membres de la famille des parvovirus. Ils contiennent de l'ADN simple brin qui peut contenir un transgène de 5 kb, suffisant pour la majorité des angiogènes candidats. Ces virus sont non-pathogènes pour l'homme et peu immunogènes. Ils s'intègrent de manière aléatoire au génome mais ne nécessitent pas des cellules qu'elles soient en phase de division.

La thérapie génique ex vivo consiste à prélever des cellules, à les transfecter en dehors de l'organisme puis à les réimplanter. En ce qui concerne les thérapies pro-angiogéniques, ce type de protocole ne se prête pas bien à la revascularisation cardiaque ou des membres, par contre, elle peut s'envisager dans le cas de transplantation d'organe où le cœur est perfusé ex vivo par l'angiogène pour éviter sa dissémination dans l'organisme.

Pour optimiser l'utilisation des molécules pro-angiogéniques, il est nécessaire de bien contrôler la voie d'administration et la cinétique de production du transgène. Les AAV, de par leur nature peu immunogène et donc leur persistance plus prolongée dans l'organisme, représentent un espoir de traitement plus efficace que les adénovirus. La combinaison optimale des facteurs reste à déterminer dans chaque situation. Pour la revascularisation cardiaque, Webster rapporte une synergie entre VEGF et bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), VEGF et angiopoïétine-1, ainsi qu'entre VEGF et HGF (Hepatocyte Growth Factor) [194].

La sécurité est également une question majeure : la dissémination des molécules pro-angiogéniques pourrait favoriser la croissance d'une tumeur quiescente ou déclencher une rétinopathie. Or les patients cibles de cette thérapeutique regroupent des personnes âgées et des diabétiques, ce problème ne doit donc pas être ignoré.

Pour éviter les problèmes liés à la dissémination du transgène, l'utilisation d'un promoteur spécifique de molécules exprimées par les cellules endothéliales, comme par exemple le promoteur des pré-proendothélines (PPE-1) qui sont des peptides produits par les cellules endothéliales sous l'effet de l'hypoxie, des médiateurs inflammatoires ou de l'étirement des vaisseaux par la pression sanguine, pourrait servir à diriger l'expression des gènes d'intérêt vers les cellules endothéliales [189]. Webster suggère également l'utilisation d'un AAV, et un promoteur du gène d'intérêt comportant des séquences HRE (hypoxia response elements) activées par des HIF ("hypoxia inducible factors") spécifiques des tissus visés par la thérapie génique. L'AAV est choisi pour son efficacité et sa capacité d'intégration au génome. Le gène serait donc latent en conditions normales d'oxygénation, et activé en cas d'ischémie [194].

II. Les médiateurs de l'angiogenèse

Comme nous l'avons décrit dans la première partie, plusieurs types cellulaires interviennent dans le déroulement du processus angiogénique. Ceci nécessite des moyens de communication intercellulaire complexes que nous allons décrire. Les facteurs de croissance sont les médiateurs les plus spécifiques et les plus puissants. Historiquement, ils ont souvent été décrits comme des mitogènes d'où leur nom de facteur de croissance. Les cytokines sont des médiateurs impliqués dans la communication intercellulaire, elles peuvent entraîner des modifications du phénotype de la cellule destinataire du message autant que sa multiplication (expression de molécules de surface, sécrétion d'autres cytokines...). Les chémokines associent aux fonctions des cytokines une capacité d'attraction et donc d'orientation de la migration cellulaire. En réalité, ces distinctions s'effacent peu à peu au fur et à mesure que la connaissance des molécules s'approfondie et que l'on découvre de nouvelles potentialités à chacune d'entre elles. Enfin, nous aborderons les molécules d'adhésion, présentes à la surface cellulaire, qui ne sont donc pas libérées comme les facteurs précédents, mais qui jouent un rôle primordial dans le déroulement de l'angiogenèse.

A. Les facteurs de croissance

1. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

Le VEGF fut tout d'abord décrit en 1989 comme un facteur mitogénique des cellules endothéliales et un facteur augmentant la perméabilité vasculaire [45]. Son importance en tant que régulateur central de la vasculogenèse est incontesté, comme en témoigne le phénotype létal des souris dont le gène du VEGF a été supprimé [38].

Il s'agit d'une glycoprotéine homodimérique de 34 à 46 kDa dont la séquence est faiblement homologue des chaînes A et B du Platelet Derived Growth Factor (PDGF). Actuellement, cinq gènes de protéines de la famille du VEGF ont été décrits, plus des isoformes d'origine virale.

Le VEGF est sécrété en réponse au stress hypoxique ou ischémique, mais également suite à la stimulation par certains facteurs de croissance (PDGF, Epidermal Growth Factor, $TNF\alpha$, $TGF\beta 1$, $IL-1\beta$). Le VEGF est un facteur de survie et de prolifération des cellules endothéliales microvasculaires humaines.

Il en existe six isoformes issues d'un épissage alternatif de l'ARN messenger : VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆. Les formes 121 et 165 sont prédominantes mais l'activité du VEGF₁₂₁ est 50 à 100 fois plus faible que celle du VEGF₁₆₅. Les formes longues contiennent des séquences de liaison aux heparan sulfate proteoglycans (HSPG) de la surface cellulaire et de la matrice extra-cellulaire. Le VEGF est produit par les cellules normales dans les phénomènes inflammatoires chroniques [84]. Il est également sécrété par un grand nombre de cellules néoplasiques différentes, dont les sarcomes de kaposi, gliomes, mélanomes, cancers rénaux, myélomes et cellules leucémiques. Ces dernières expriment les récepteurs au VEGF dans 50 % des cas et le VEGF semble alors jouer un rôle autocrine, comme par exemple pour les cancers d'origine hématopoïétique [19]. Il a même été suggéré qu'il puisse intervenir lors du passage du stade bénin au stade malin d'une tumeur [101].

Trois autres molécules de la famille ont été décrites. Le VEGF-B ne présente pas d'activité mitogénique sur les cellules endothéliales, par contre, il induit l'expression et augmente l'activité de urokinase Plasminogen Activator (uPA, voir II D 2). Ceci suggère que le VEGF-B joue un rôle régulateur de la dégradation de la matrice extra-cellulaire, et donc de la migration cellulaire. Le VEGF-C est exprimé préférentiellement dans le poumon, le cœur et le rein ainsi que dans les veines embryonnaires. Il s'agit vraisemblablement d'un facteur de croissance pour les cellules du réseau lymphatique [191]. Le VEGF-D, exprimé dans le poumon et l'intestin, semble être un mitogène des cellules endothéliales microvasculaires. Enfin, le Placental Growth Factor (PlGF) dont l'expression, contrairement à ce que son nom évoque, n'est pas limitée au placenta (thyroïde, poumon). Il en existe trois isoformes : PlGF₁₃₁, PlGF₁₅₂ et PlGF₂₁₆.

Une protéine virale (VEGF-E ou Orf) de la famille des poxvirus est capable de se lier au VEGF-R2 et à la neuropiline-1 : l'infection par ce virus provoque des lésions caractérisées par une prolifération et une dilatation anarchique de capillaires qui s'explique par la capacité du VEGF-E à se lier au VEGF-R2 et à induire l'angiogenèse [122]. La protéine HIV-1/Tat, qui, elle, ne possède pas d'analogie structurale avec le VEGF, est pourtant capable de se lier au VEGF-R2, et elle pourrait être impliquée dans l'émergence du syndrome de Kaposi chez les malades atteints par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) [3].

L'hypoxie induit la production de VEGF et de PlGF mais n'influence pas celle de VEGF-B, C ou D. Le mécanisme implique une augmentation de la transcription et de la stabilité des ARN

messagers. En effet, la structure de l'ARN du VEGF le rend particulièrement instable (éléments déstabilisants au niveau des régions non-codantes en 3' et 5' du gène). L'hypoxie active certains facteurs de transcription appelés "facteurs inductibles par l'hypoxie" (ou HIF). C'est le cas de HIF α qui se dissocie de HSP90 (protéine de choc thermique), se transloque dans le noyau et active des gènes cibles dont les enzymes glycolytiques, l'érythropoïétine, le VEGF et ses récepteurs [65]. Plusieurs arguments vont dans le sens d'une induction tissu spécifique.

Plusieurs structures membranaires reconnaissent les peptides de la famille du VEGF :

- Les récepteurs à tyrosine kinase caractérisés par un domaine extracellulaire comportant 7 domaines de type immunoglobuline et un domaine intracellulaire tyrosine kinase. Les 2 premiers domaines extracellulaires interviennent dans la reconnaissance du VEGF, le troisième à la liaison de haute affinité et le quatrième à la dimérisation du récepteur.
 - o VEGF-R1 ou Flt-1 : capable de lier VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF-B et PlGF, phénomène induisant une autophosphorylation suivie d'une phosphorylation de GAP et de la phospholipase- γ C, ce qui aboutit à la migration des cellules endothéliales. La liaison de Flt-1 implique aussi la production d'urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA) et l'activation de la Métalloprotéinase-2 de la Matrice (MMP-2) [137].
 - o VEGF-R2 ou Flk1 ou encore KDR : capable de se lier à tous les membres de la famille excepté PlGF et VEGF-B. L'activation de Flk1 conduit à une cascade de transduction du signal passant par l'activation de la protéine kinase C (PKC), de la phosphoinositol-3 kinase [70], mais également, grâce au recrutement de Grb2 et de SOS à l'activation de la voie ras puis de la MAP kinase, sans oublier l'activation de la JAK-STAT kinase [191] (voir figure 2). Ceci induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération. Ce récepteur joue également un rôle important pour la différenciation des hémangioblastes en cellules endothéliales.
 - o VEGF-R3 ou Flt4 qui se lie au VEGF-C et D, et qui est présent au niveau des angioblastes et des vaisseaux lymphatiques.

- Les structures sans rôle de transmission du signal comme les HSPG (heparan sulfate proteoglycans).
- Ou plus récemment découverte, la neuropiline, qui joue le rôle de protéine chaperonne ou de co-récepteur en augmentant la capacité de liaison du VEGF à son récepteur Flk1/KDR. La neuropiline-1 se lie au VEGF₁₆₅, par la région issue de l'exon 7 (absente du VEGF₁₂₁), au VEGF-B et au PlGF. Les sémaphorines, qui sont les autres ligands de la neuropiline et qui interviennent dans la formation du tissu nerveux, agissent comme des inhibiteurs compétitifs du VEGF sur les cellules endothéliales. La présence de ces molécules et récepteurs sur certaines cellules tumorales évoque un mécanisme complexe de contrôle de l'angiogenèse par la tumeur [123].

Le VEGF a été initialement appelé facteur de perméabilité vasculaire et il est le seul facteur angiogénique à posséder cette caractéristique. Il induit cette perméabilité selon 2 voies intracellulaires indépendantes : La voie dépendante de ras et des MAP Kinases où il induit la phosphorylation de la phospholipase A2 (PLA2), et la voie dépendante de la PLC γ puis de la PKC et aboutissant à la libération du calcium intracellulaire, ainsi qu'à l'activation de PLA2. Dans les 2 cas, il y a ensuite production d'acide arachidonique et de PAF [172].

Il existe une isoforme naturelle soluble du VEGF-R1 issue d'un épissage alternatif, mais aucune de VEGF-R2 ou R3. L'hypothèse actuellement admise est qu'il pourrait s'agir d'un récepteur leurre permettant de limiter la biodisponibilité du VEGF : la formation d'hétérodimères, entre un récepteur membranaire et un récepteur soluble, est responsable de l'incapacité du récepteur membranaire à transmettre le signal. Ceci éviterait la prolifération des cellules endothéliales dans la lumière des vaisseaux. La surexpression de la forme soluble, suite à une transfection ou à l'infection par un adénovirus recombinant, a montré sa capacité d'inhibition de l'angiogenèse dans des modèles tumoraux ou physiologiques [82].

Il est intéressant de noter que Flt-1 peut également être sécrété et agir dans ce cas comme un compétiteur du VEGF en le captant. Comme le rappellent Carmeliet et coll., la délétion de Flt-1 empêche le développement normal de la vascularisation, pourtant la délétion de son domaine tyrosine kinase n'entraîne pas ce genre d'effet : le récepteur VEGF-R1 pourrait donc

avoir pour rôle principal de piéger le VEGF et de le rendre moins disponible pour le VEGF-R2. La neutralisation du VEGF-R1 par un anticorps aboutit en effet à une potentialisation du développement vasculaire. Le mécanisme d'action du PlGF pourrait également utiliser cette propriété des récepteurs du VEGF : en occupant le VEGF-R1, le PlGF déplace le VEGF vers le récepteur R2, beaucoup plus efficace dans la transduction du signal mitogénique, d'où une potentialisation de son effet. L'absence de PlGF se traduit effectivement par une diminution de l'angiogenèse pathologique, dans de multiples modèles in vivo (tumeurs, néovascularisation rétinienne, ischémie myocardique...) [39].

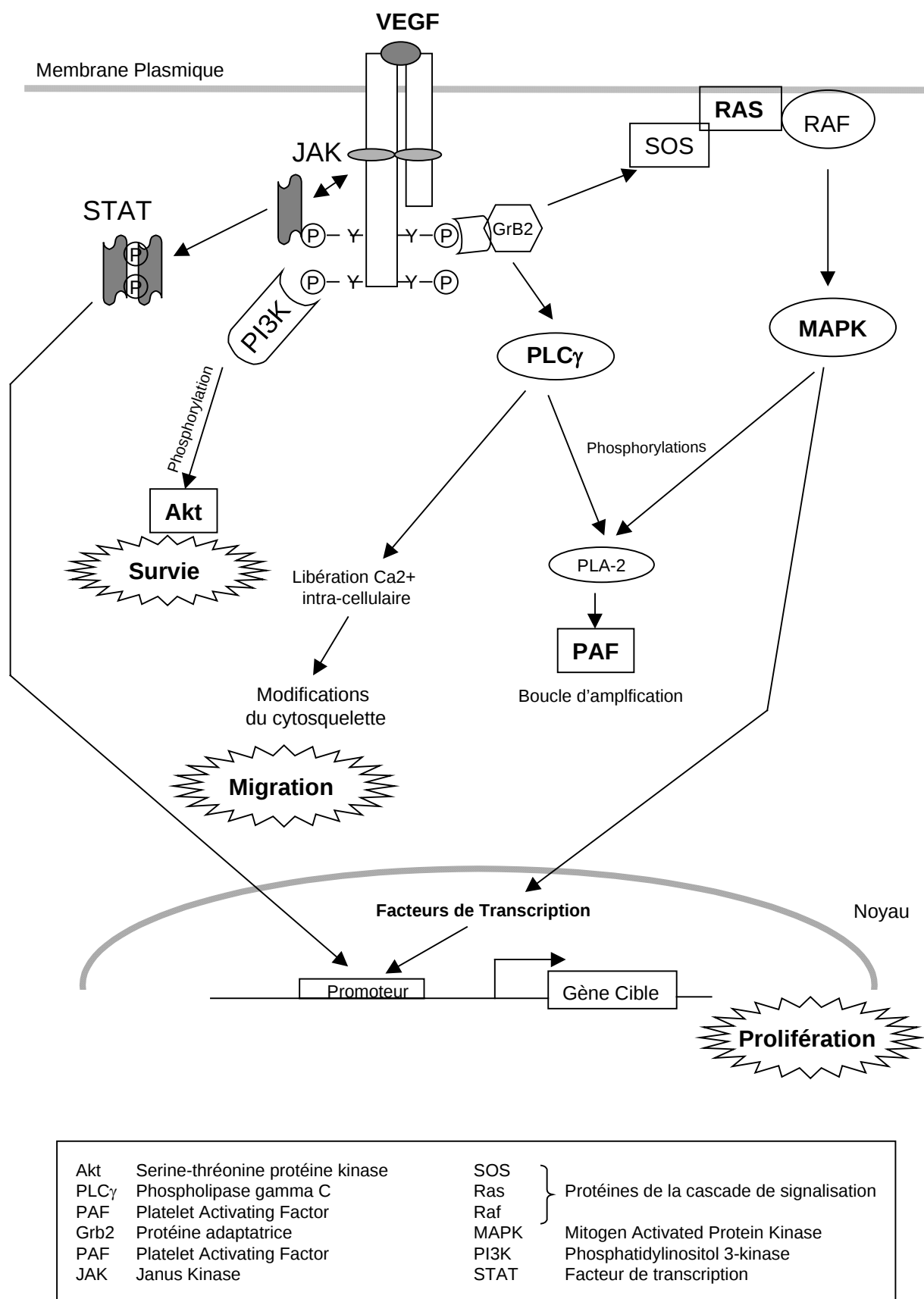


Figure 2 : **Différentes voies de signalisation intracellulaire du VEGF** (d'après les descriptions de Sirois et coll. [172], Gerber et coll. [70], Veikkola et coll. [191])

2. FGF (Fibroblast Growth Factor)

Ce médiateur appartient à la famille des facteurs de croissance liés à l'héparine. Il induit la prolifération et la migration dirigée des cellules endothéliales ainsi que la production de protéases. Il est constitué d'une chaîne polypeptidique simple d'environ 140 acides aminés.

Parallèlement à son effet sur l'angiogenèse, le FGF possède de nombreuses cellules cibles : il intervient dans l'hématopoïèse normale, la différenciation des fibroblastes en adipocytes, c'est un facteur de survie et un mitogène pour certaines cellules neuronales (oligodendrocytes, astrocytes et cellules de Schwann), etc. Les FGF interviennent également dans la régénération du cartilage.

Historiquement, le bFGF ou FGF-2 ou encore FGF basique fut le premier FGF isolé. Il induit une forte mitogenèse des fibroblastes et des cellules endothéliales. C'est aussi un facteur fortement chimiotactique pour ces cellules. Un second membre de la famille, le aFGF ou FGF-1 ou FGF acide, fut isolé peu de temps après. Il existe des oncogènes dont l'homologie structurale avec le FGF est très forte, comme int-2, hst ou FGF-5. Contrairement aux aFGF et bFGF qui sont séquestrés à la surface cellulaire et dans la matrice adjacente, ces oncogènes sont sécrétés. On peut noter que ni le aFGF, ni le bFGF ne possèdent de peptide-signal permettant leur exportation et le mécanisme impliqué dans le transfert vers l'extérieur de la cellule n'est pas élucidé [177], mais il semble s'agir d'un mécanisme actif, indépendant du système réticulum endoplasmique/Golgi [62], et lié aux protéines de choc thermique (HSP) [118]. La faible efficacité de libération de ces facteurs suggère qu'il puisse s'agir d'une cytokine secondaire, relayant le VEGF de manière autocrine ou même intracrine [25]. Le bFGF est largement distribué dans les tissus normaux et pathologiques alors que le aFGF reste exprimé dans les tissus neuronaux, osseux et tumoraux. Le aFGF a également été impliqué dans le mécanisme de néovascularisation des plaques d'athérosclérose [132].

Plusieurs récepteurs ont été décrits : FGF-R1 ou flg, FGF-R2 ou bek, FGF-R3 et R4 [25]. Ces récepteurs ont une structure commune, comprenant un domaine tyrosine kinase intracytoplasmique conservé, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire de liaison au FGF dont il existe des variants issus d'épissage alternatif : la présence ou l'absence de la première boucle de type immunoglobuline est responsable des variations d'affinité du récepteur. Un récepteur à motifs riches en cystéine et dépourvu de propriétés de transmission de signal a été décrit : sa fonction n'est pas connue actuellement. La liaison du FGF-2 à son

récepteur induit sa dimérisation et son autophosphorylation. Il s'ensuit la cascade classique de phosphorylation impliquant la Phospholipase- $C\gamma$ (PLC γ) et la protéine ras. Les différentes voies de transduction impliquées sont indépendantes et conduisent à des effets spécifiques [25].

Il a été suggéré par Roghani et coll. que les HSPG augmentent l'affinité du FGF pour ses récepteurs, d'où la potentialisation de son action [154]. Les HSPG pourraient également jouer un rôle important de protection du FGF vis à vis des enzymes protéolytiques [25]. Dans le sang, le FGF-2 s'associe à l' α_2 -macroglobuline ou à la forme tronquée du FGF-R1, cette dernière étant également présente au sein de la matrice extracellulaire. Ces interactions avec différentes molécules interviennent dans la régulation fine de la biodisponibilité du FGF.

Le FGF régule l'expression de nombreuses molécules impliquées dans l'angiogenèse, des collagénases à l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), aux intégrines β_1 et $\alpha_v\beta_3$.

3. HGF (Hepatocyte Growth Factor)

Le HGF est une glycoprotéine hétérodimérique de 82 kDa qui est le ligand du proto-oncogène c-met, un récepteur à tyrosine kinase transmembranaire présent sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses [133]. Identique au Scatter Factor, sécrété par les fibroblastes, il est capable d'induire in vitro la motilité et l'invasion par les cellules épithéliales normales ou malignes. Le HGF stimule la prolifération des cellules endothéliales in vitro et l'angiogenèse in vivo [37]. La concentration en HGF augmente dans les muscles squelettiques ainsi que dans le myocarde après un stress ischémique. Il augmente secondairement la production de VEGF par les fibres musculaires lisses et de Platelet Activating Factor (PAF) par les macrophages [37].

4. PAF (Platelet Activating Factor)

C'est une molécule appartenant à la famille des phosphoglycérides alkyl acétylés, produites par les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales [149]. Il induit la perméabilité des cellules endothéliales cultivées en monocouche : des modifications du squelette cellulaire entraînent la rétraction cellulaire et la formation d'espaces intercellulaires [35].

PAF induit également la migration dirigée des cellules endothéliales in vitro mais, d'après Camussi, reste sans effet sur leur prolifération [36]. Il stimule l'angiogenèse in vivo par un mécanisme dépendant de l'héparine. Le PAF semble relayer l'activité de HGF et du Tumor Necrosis Factor α (TNF α) [37]. PAF pourrait également être le messager responsable de la perméabilité induite par le VEGF [172]. La liaison de ces médiateurs (VEGF, HGF, TNF α) avec leurs récepteurs respectifs induit l'activation de la PLC γ et de la PKA (voir figure 3). La PLC γ induit la formation de diacylglycerol (DAG) qui active la PKC, et la libération du calcium intracellulaire qui intervient dans la structure du cytosquelette. L'activité de la PKC et de la PKA conjointement permet la sécrétion de PAF. Les FGF ne stimulent pas l'activation de la PKA, ce qui pourrait expliquer pourquoi ils n'induisent pas PAF. Le récepteur de PAF interagit avec une protéine G qui active également la PLC γ , ce qui correspond à une boucle d'amplification du signal, boucle qui peut s'exercer de manière autocrine mais aussi paracrine [172]. Récemment, le monoxyde d'azote a également été impliqué comme relais de la signalisation par PAF [129].

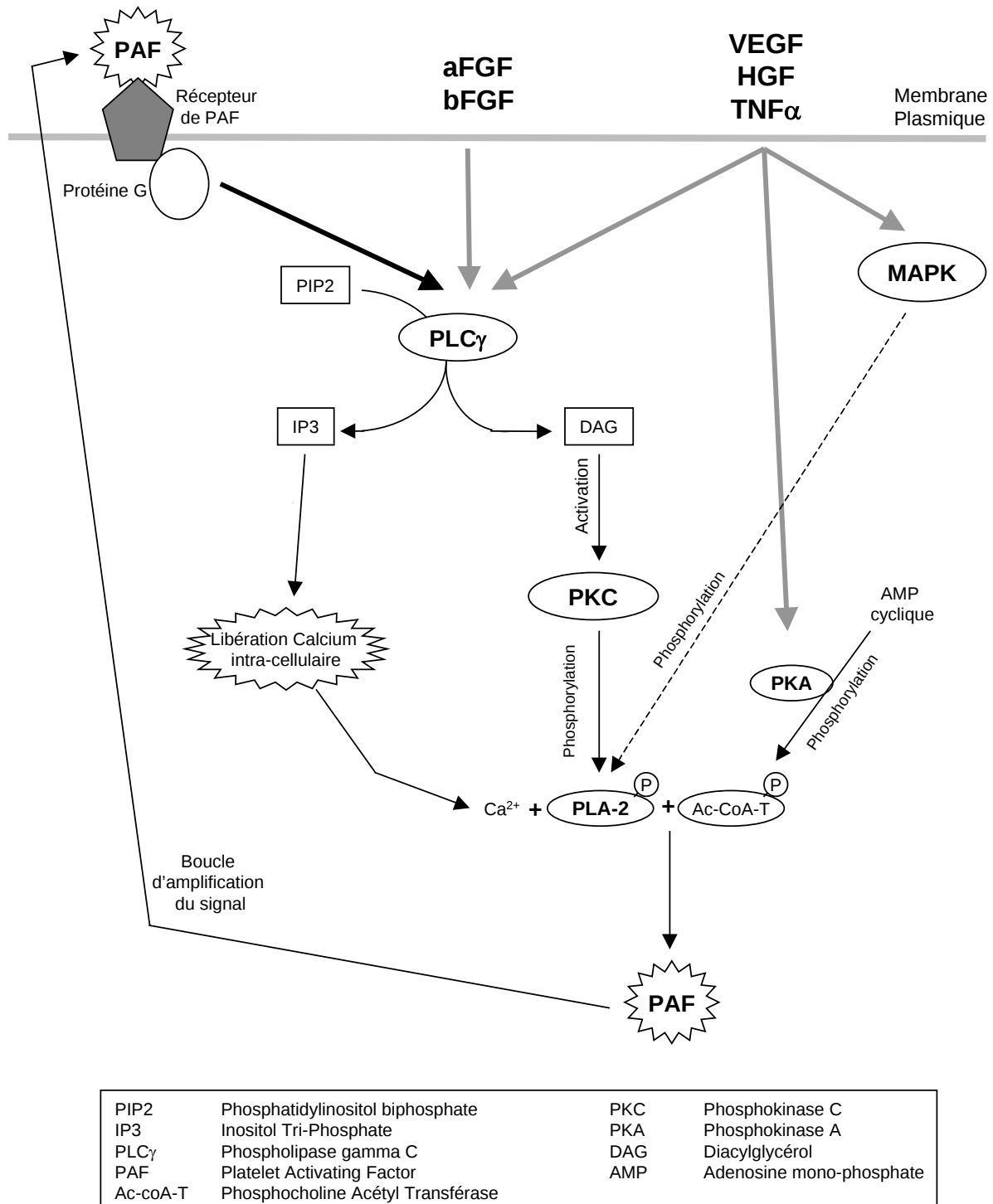


Figure 3 : **Voies de signalisation cellulaire aboutissant à la production de Platelet Activating Factor** (d'après la description de Sirois et coll. [172], et Camussi et coll. [37])

5. PD-ECGF/TP (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor/Thymidine Phosphorylase)

Il s'agit d'une protéine dimérique de 90 kDa présente dans les plaquettes sanguines mais également dans les macrophages (dont les macrophages alvéolaires), les cellules de Kupffer, les cellules stromales placentaires et les cellules endothéliales du placenta, des ovaires, des glandes salivaires et du cerveau. Contrairement à la majorité des facteurs angiogéniques, le PD-ECGF ne se lie pas à l'héparine, alors qu'il a en commun avec les FGF de ne pas posséder de séquence hydrophobe d'exportation et un mécanisme de sécrétion inconnu. Il stimule la mitogenèse et la migration des cellules endothéliales in vitro et induit l'angiogenèse in vivo [73]. Sa concentration est particulièrement élevée dans les tumeurs solides, la synovie des articulations atteintes de polyarthrite rhumatoïde et les lésions du psoriasis.

Il possède une activité thymidine phosphorylase, essentielle pour son activité angiogénique [126]. Elle consiste à déphosphoryler la thymidine en thymine et 2-deoxyribose-1-phosphate, lui-même dégradé en 2-deoxy-D-ribose : d'après Griffiths [73], ce dernier produit de dégradation est responsable de la mitogenèse et de l'activité chimotactique du PD-ECGF.

De manière fortuite, il se trouve que l'activité angiogénique du PD-ECGF est bloquée par l'utilisation en chimiothérapie du 5-fluorouracil (5-FU utilisé pour sa capacité à stopper la réplication de l'ADN dans les cellules tumorales) : la thymidine phosphorylase catalyse l'activation du 5-FU en y liant du 2-deoxyribose-1-phosphate, qui n'est alors plus disponible pour être converti en substance pro-angiogénique [73].

6. PDGF (Platelet Derived Growth Factor)

Il induit la croissance et la motilité des fibroblastes et des cellules musculaires lisses, mais également des cellules endothéliales et des neurones. C'est un mitogène pour les cellules musculaires périvasculaires. Son récepteur est retrouvé sur une partie des cellules endothéliales seulement, en particulier les cellules microvasculaires et celles des tubules en formation, mais il est absent des cellules quiescentes. Ceci va dans le sens d'une augmentation d'un processus déjà initié. Toutefois, lorsque le récepteur de PDGF n'est pas exprimé sur les cellules endothéliales, il active les cellules musculaires avoisinantes, ce qui suffit à déclencher la cascade de l'angiogenèse [161].

7. Angiopoïétines

Quatre molécules appelées angiopoïétines ont été décrites dont deux sont les ligands du récepteur Tie2, ou Tek. Tie1 et Tie2 sont des récepteurs exprimés spécifiquement sur les cellules endothéliales. Le ligand du récepteur Tie1 n'est pas connu actuellement. Les angiopoïétines sont des protéines glycosylées d'environ 70 kDa. L'angiopoïétine-1 intervient dans la formation des tubules vasculaires : les souris KO pour Tie-2 possèdent des structures tubulaires mais il n'y a pas d'établissement de connections de type réseau vasculaire. La liaison du récepteur Tie2 entraîne une cascade de phosphorylations aboutissant à un signal de survie cellulaire lié à l'activité de la PI3 kinase. L'inhibition, via un récepteur leurre de Tie2, de ce signal est efficace pour limiter la croissance tumorale chez la souris [89].

L'angiopoïétine-1 a un rôle stabilisateur pour les vaisseaux matures, grâce au recrutement des cellules périendothéliales, et elle est exprimée constitutivement chez l'adulte. Elle n'a pas d'activité in vitro sur les cellules endothéliales ce qui confirme que son mode d'action passe par le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses [24]. Par contre, l'angiopoïétine-2 est préférentiellement exprimée au niveau des sites d'angiogenèse active, où elle agit comme un inhibiteur compétitif de l'angiopoïétine-1 : elle inhibe l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules support périendothéliales pour faciliter leur migration. En présence de VEGF, cette déstabilisation de la matrice favorise la croissance des vaisseaux, alors qu'en son absence cela induit plutôt leur régression [91].

8. Somatostatine

La somatostatine est une hormone hypothalamique de type tetra-decapeptide. Elle inhibe la libération par la glande pituitaire d'hormone de croissance et d'hormone stimulatrice de la thyroïde, et la libération d'hormone pancréatique et du tractus gastrointestinal. Elle agit également comme un neurotransmetteur, immunomodulateur, ainsi que comme inhibiteur de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire. Elle se lie à des récepteurs spécifiques (SSTR) dont il existe 5 sous-types. Tous ces récepteurs sont fonctionnellement liés à une adénylyl-cyclase intracellulaire : l'activation des récepteurs aboutit à l'inhibition de l'accumulation intracellulaire d'adénosine monophosphate cyclique, ce qui interrompt la cascade d'activation de la protéine kinase A et la prolifération cellulaire qui en résulte. De même, la somatostatine stimule l'activité de phosphatases qui interfèrent avec les cascades de phosphorylation situées en aval des récepteurs de nombreux facteurs de croissance. L'activité angiostatique de la

somatostatine est liée à l'inhibition de la croissance des cellules endothéliales par ces différents mécanismes [136].

9. Angiogénine

Il s'agit d'une protéine d'environ 14 kDa formée d'une chaîne protéique unique comportant 123 acides aminés chez l'homme. Les angiogénines de souris, de lapin, de porc et de bovin ont entre 64 et 75 % d'homologie avec la séquence de l'angiogénine humaine, les substitutions conservatives constituant la majorité des différences [11].

L'angiogénine induit à la fois la prolifération et la migration des cellules endothéliales, mais aussi la formation de tubules vasculaires. L'angiogénine augmente la transcription de l'urokinase-type plasminogen activator (uPA) et du plasminogen inhibitor 1 (PAI-1) [88].

L'angiogénine est fortement homologue avec la ribonucléase-1 (Rnase-1) pancréatique dont elle partage l'activité ribonucléasique vis à vis des ARN ribosomiaux et de transfert (mais elle est beaucoup moins active). Elle se lie à la protéine inhibitrice de la Rnase-1. L'intégrité du site ribonucléasique est indispensable à son activité angiogénique, mais un domaine de liaison cellulaire est également requis. En effet, un récepteur de haute-affinité pour l'angiogénine existe en surface des cellules sub-confluentes (endothéliales et musculaires lisses) et induit des signaux intracellulaires [11]. L'angiogénine induit faiblement la formation de DAG, mais aussi la transcription de c-fos et c-jun [23,88].

La concentration d'angiogénine circulante dans le plasma est relativement importante, de l'ordre de 110-380 ng/ml chez l'homme et 100-180 ng/ml chez les bovins. Elle est également retrouvée dans le lait, les glandes mammaires, la vésicule biliaire, le foie et le péritoine. Des expressions anormalement élevées ont été retrouvées dans plusieurs cancers comme celui du pancréas, des ovaires et du col de l'utérus [11].

B. Les cytokines

Les cytokines, protéines solubles non-spécifiques, sont des médiateurs essentiels du développement et de la régulation de la réponse immune. Elles sont classiquement regroupées en interleukines (agissant sur les lymphocytes), en facteurs de stimulation de colonie (Colony Stimulating Factors, dans la régulation de l'hématopoïèse), en membres de la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF α), et en facteurs de croissance transformants (TGF). L'action des cytokines sur l'angiogenèse n'est pas précisément élucidée à l'heure actuelle, on retrouve des actions qui peuvent sembler opposées pour une même cytokine, ce qui participe certainement à la finesse de la régulation du système.

1. Pro-angiogéniques

a) TNF α (Tumor Necrosis Factor- α)

L'inflammation, et donc l'activation des macrophages, entraîne la production de nombreuses cytokines comme le TNF α et l'IL-1 β . Le TNF α est responsable de l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales via la sur-expression des molécules d'adhésion sur les 2 types cellulaires et l'augmentation de la production de GM-CSF. Arras et coll. ont démontré le recrutement précoce des monocytes circulants dans un modèle d'ischémie fémorale aiguë chez le lapin et leur rôle dans la sécrétion de TNF α et de bFGF [9].

Il semble que le TNF α agisse par un mécanisme indirect : il induit la production d'IL-8, de VEGF et de bFGF de manière autocrine par les cellules endothéliales, via l'activation de plusieurs facteurs de transcription (NF-kB, Sp1, AP-1), ainsi que l'augmentation de l'expression de leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales [202].

b) Monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote n'est pas à proprement parler une cytokine, pourtant il est fortement lié aux cytokines pro-inflammatoires, en particulier de type TNF α , Interferon γ et Interleukine-1. Il est induit très rapidement suite à ce type de stimulation et intervient alors comme un second messager, son action paraît donc indissociable de celle des cytokines.

C'est une molécule dérivée de la L-arginine, issue de l'activité d'une enzyme appelée NO synthase dont il existe plusieurs isoformes : 2 isoformes sont dépendantes du calcium, la NOS endothéliale et la NOS neuronale, et une est indépendante du calcium et activable par

différents stimuli pro-inflammatoire, la NOS inductible. Un des rôles important du NO est de provoquer la vasodilatation et il est donc impliqué dans l'augmentation du flux sanguin porteur de nutriments et d'oxygène vers les tissus. Le rôle du NO dans l'angiogenèse reste très controversé comme le décrivent Dachs et Chaplin [48]. Plusieurs arguments vont dans le sens d'un effet proangiogénique du NO : la dilatation des vaisseaux provoque en effet un étirement des cellules endothéliales qui est favorable à la sortie du stade quiescent vers un stade activé et réplicatif, le NO intervient dans la cascade de signalisation du VEGF [207], le NO favorise l'expression des métalloprotéinases et inhibe celle des TIMP [140], et l'hypoxie entraîne une augmentation de l'expression de iNOS car le promoteur du gène de iNOS contient des séquences régulatrices de type HRE [48]. Mais plusieurs études, in vitro ou dans un essai CAM, ont montré que le NO pouvait inhiber la migration et la croissance des cellules endothéliales [48].

D'autre part, l'administration systémique d'inhibiteurs des NOS est délicate car elle diminue le flux sanguin au niveau rénal et risque de provoquer une insuffisance rénale.

c) TGF β (Transforming Growth Factor- β)

Le TGF β est une molécule homodimérique de 25 kDa sous sa forme active, comportant 3 isoformes (TGF- β 1, - β 2 et - β 3). Il est sécrété sous la forme d'un précurseur de 390 acides aminés. In vivo, le TGF β augmente l'angiogenèse via le recrutement de macrophages activés et de fibroblastes sécrétant des substances pro-angiogéniques [114]. Ces mêmes cellules ont également un rôle stabilisateur et interviennent dans le maintien de l'intégrité des parois vasculaires. Pourtant, in vitro, le TGF β a un effet antiangiogénique : il inhibe la prolifération des cellules endothéliales en régulant leur différenciation [160].

Le TGF β inhibe la migration cellulaire et la production de protéases induites sous l'action du bFGF. Or le bFGF augmente l'expression de l'uPA qui en retour active le TGF β latent : il s'agit d'une boucle de rétrocontrôle. En fait, in vitro et à faible concentration, le TGF β stimule l'action du bFGF alors qu'à concentration plus forte, il l'inhibe [25].

2. Anti-angiogéniques

a) Interleukines 12 et 18 (IL-12, IL-18)

L'interleukine-12 (IL-12) est une cytokine hétérodimérique composée d'une chaîne légère (p35) et d'une chaîne lourde (p40). Elle est principalement produite par les cellules présentatrices d'antigènes et se lie à des récepteurs présents sur les cellules T et NK. Elle induit une forte réponse immunitaire de type cellulaire (Th1). Elle exerce un effet anti-angiogénique en induisant la production d'Interféron- γ (IFN γ), phénomène principalement observé dans les cellules immunitaires mais également dans les cellules endothéliales [59], et secondairement celle des chémokines IP-10 (Interferon Inducible Protein-10) et MIG (Monokine Induced by IFN γ). L'utilisation d'anticorps neutralisants anti-IFN γ abroge totalement l'effet anti-angiogénique de l'IL-12 chez la souris et l'utilisation d'IL-12 n'a aucun effet sur la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* [166]. Une diminution de l'expression de VEGF, bFGF, des métalloprotéinases et une augmentation des TIMPs (Inhibiteurs Tissulaires des MMP) a également été rapportée et pourrait jouer un rôle complémentaire de l'action des chémokines [57,59].

L'interleukine-18 (IL-18) est une cytokine produite par les cellules de Kupffer et les macrophages activés. Elle est également capable d'induire la production d'IFN γ et exerce donc son activité antiangiogénique de manière similaire à l'IL-12 [46]. Toutefois, des résultats récents impliquent l'IL-18 en tant que médiateur pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* [142].

b) Interférons

Comme nous venons de l'évoquer, l'IFN γ exerce son activité principalement en induisant la sécrétion d'IP-10 et MIG, et en diminuant la production de VEGF [57].

Les interférons α et β sont 2 cytokines qui agissent en diminuant l'expression du bFGF dans de nombreux néoplasmes (rein, vessie, prostate, colon) [25]. Toutefois, l'IFN α associé à l'IL-2 stimule la croissance des cellules endothéliales *in vivo* [47].

c) TNF α (Tumor Necrosis Factor- α)

Le TNF α possède également des propriétés anti-angiogéniques : il a été suggéré que les effets antagonistes du TNF α soient le résultat d'une concentration et d'une durée d'exposition

différentes [61]. Selon Defilippi et coll., le $\text{TNF}\alpha$, associé à l' $\text{IFN}\gamma$, entraîne une diminution de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de plus de 70 % par un mécanisme de régulation traductionnel (chaîne β_3) et ceci de façon spécifique puisque les récepteurs de la laminine (chaîne β_1) ne sont pas altérés [53]. Stromblad et coll. suggèrent d'autre part que le $\text{TNF}\alpha$ et l' $\text{IFN}\gamma$ interrompent le signal de survie lié à $\alpha_v\beta_3$ et favorisent de ce fait l'activité de la p53, responsable de la mort apoptotique des cellules endothéliales [179]. Ceci semble confirmé par Ruegg et coll. qui utilisent en combinaison le $\text{TNF}\alpha$, l' $\text{IFN}\gamma$ et le melphalan chez des patients atteints de mélanomes métastatiques et constatent le détachement et l'apoptose des cellules endothéliales. Ce phénomène n'est pas ici relié à une diminution de l'expression de $\alpha_v\beta_3$ mais plutôt à un changement conformationnel des intégrines bloquant la transduction du signal de survie. L'activation exogène de ce signal (phorbol ester qui restore l'activité de la PKC) aboutit à la récupération de l'activité de liaison de l'intégrine [157].

d) $\text{TGF}\beta$ (Transforming Growth Factor- β)

Comme il a été évoqué un peu plus tôt, l'activité du $\text{TGF}\beta$ dans l'angiogenèse est assez complexe. Il semble notamment qu'il ait des propriétés angiostatiques dans l'œil, qu'il soit présent à l'état physiologique dans le vitré, et participe au maintien de l'absence de vascularisation de l'œil. Le $\text{TGF}\beta$ est sécrété sous une forme latente qui nécessite un clivage pour devenir active. Le blocage de l'activité de la plasmine qui clive le pro- $\text{TGF}\beta$ peut aboutir à l'émergence de phénomènes pathologiques tels que des néovascularisations rétinienne [146]. L'utilisation d'un adénovirus recombinant pour le $\text{TGF}\beta$ a également montré sa capacité à inhiber l'opacification cornéenne induite par le nitrate d'argent chez la souris [158]. Une production de $\text{TGF}\beta$ dans des cancers du sein est corrélée à une diminution de la vascularisation [96].

C. Les chémokines

Les chémokines se démarquent des cytokines de part leur activité chimotactique, et par un motif commun de leur structure protéique (CXC, voir plus bas). Certaines d'

1. Pro-angiogéniques

Les chémokines de type CXC sont typiquement des protéines de liaison à l'héparine. Leur structure comprend 4 résidus cystéine très conservés, séparés au centre par un résidu variable. L'extrémité N'-terminale de certaines molécules de la famille comporte un motif ELR, c'est à dire Glycine-Leucine-Arginine. Ces molécules sont des promotrices de l'angiogenèse : IL-8, Epithelial Activating Protein-78 (ENA-78), Growth Related Genes (GRO- α , - β et - γ), Granulocyte Chemotactic Protein-2 (GCP-2) et la forme tronquée de la Platelet Basic Protein (PBP).

Elles induisent directement l'activité chimotactique et proliférative des cellules endothéliales in vitro et l'angiogenèse in vivo en l'absence de facteurs inflammatoires préalables [21]. Le récepteur le plus susceptible de relayer l'activité pro-angiogénique de ces molécules est le CXCR2 car il se lie à toutes les molécules ayant cette activité.

L'IL-8 tient une place importante dans l'angiogenèse des tumeurs ovariennes et pulmonaires (cancer du poumon non à petites cellules). Dans un modèle de xénogreffe, il a été montré que la déplétion en IL-8 provoquait une diminution de plus de 40 % du volume tumoral et une réduction du nombre de métastases, corrélé quantitativement à la diminution de la vascularisation de ces tumeurs [6]. Elle est également impliquée dans d'autres dysfonctionnements du système vasculaire, comme le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde.

L'ensemble des chémokines CXC ELR⁺ sont impliquées dans l'angiogenèse et la tumorigénicité de nombreux types tumoraux chez l'homme [21]. Elles sont souvent redondantes et l'existence d'un récepteur unique pourrait permettre de supprimer leur action en globalité.

2. Anti-angiogéniques

Les chémokines de type CXC ne possédant pas de domaine ELR se comportent comme des inhibitrices de l'angiogenèse. Seul SDF-1 (Stromal Cell Derived Factor-1) n'a pas d'activité clairement démontrée à l'heure actuelle : il est à la fois essentiel pour la vascularisation du tractus gastro-intestinal au moment de l'embryogenèse mais atténue l'activité angiogénique des chémokines CXC ELR⁺, du bFGF et du VEGF.

Ces chém

inhiber la dimérisation du récepteur au bFGF, en présence ou non d'héparine [144]. PF4 ne forme pas ce type de structure avec le VEGF₁₂₁, pourtant il est capable d'inhiber son action, peut-être par un signal propre : PF4 semble interagir avec des protéines impliquées dans le cycle cellulaire mais aucun récepteur capable d'assurer la transduction du signal n'est connu actuellement [68]. Le clivage de PF4 par la plasmine, aboutissant à un peptide de seulement 53 acides aminés, est capable de multiplier par plus de 50 l'efficacité de son action [75].

D. Les molécules d'adhésion et de structure intercellulaire

1. Les molécules d'adhésion

L'interaction entre les cellules endothéliales et les protéines de la matrice extracellulaire est fondamentale pour le processus angiogénique. Les cellules vasculaires doivent donc être capables de reconnaître les constituants de la matrice et de percevoir les modifications structurales de cette dernière afin de répondre de manière appropriée aux changements du milieu extra-cellulaire. Les intégrines semblent être ces senseurs. Leur expression est régulée dans le temps et l'espace pendant la durée du processus angiogénique. Tout d'abord décrites uniquement comme des facteurs d'adhésion inter-cellulaire, il est admis aujourd'hui qu'elles ont un rôle de transmission du signal vers l'intérieur de la cellule. Leur partie intracytoplasmique est liée au cytosquelette via l' α -actinine et la vinculine (revue de Brooks [30]). Elles semblent être capables d'induire des modifications du flux calcique, du pH, des phosphorylations de protéines et une régulation de l'expression génique [127,184]. Elles transmettent également un signal de survie en bloquant l'activité de la p53 [179].

Les intégrines sont une famille de molécules d'adhésion cellulaire composées par l'association non-covalente d'une chaîne α et d'une chaîne β . Environ 15 chaînes α et 8 chaînes β ont été identifiées [30]. L'association des chaînes donne une grande variété d'hétérodimères ayant des propriétés variées. Les intégrines facilitent l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire pendant leur migration.

Les intégrines reconnaissent spécifiquement les peptides contenant le motif arginine-glycine-asparagine (ou RGD), la spécificité pour une intégrine donnée étant liée aux séquences situées de part et d'autre du motif.

a) Récepteurs de la laminine

Les intégrines du groupe $\beta 1$ sont communément appelées récepteurs de la laminine, elles reconnaissent également le collagène et la fibronectine. Elles sont indispensables à la différenciation des cellules endothéliales et à la formation des tubes capillaires. La laminine comporte plusieurs parties : le RGD régule principalement l'adhésion cellulaire, le YIGSR la morphologie cellulaire et le SIKVAV la différenciation et la migration cellulaire [30].

On a pu observer une forte corrélation entre l'expression de la sous-unité $\alpha 2$ de la laminine et les capacités d'adhésion cellulaire et métastatiques de lignées de fibroblastes transformés par la protéine ras et même dans des lignées de mélanomes humains [87].

b) Récepteurs de la vitronectine

De la même façon, les intégrines possédant la chaîne β_3 sont appelées récepteurs de la vitronectine alors qu'elles reconnaissent aussi le facteur de Von Willebrand, le fibrinogène et les thrombospondines. Le $\alpha_v\beta_5$ est également regroupé dans cette famille. Les hétérodimères $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ sont préférentiellement exprimés dans les vaisseaux sanguins pathologiques mais on les retrouve également dans les tissus sains. $\alpha_v\beta_3$ est exprimée par les cellules endothéliales, parfois par les fibres musculaires lisses et certains mélanomes hautement métastatiques [165]. Elle est associée fonctionnellement à MMP-2. $\alpha_v\beta_5$ est exprimée sur un plus large panel de tumeurs.

L'expression de $\alpha_v\beta_3$ est dépendante du bFGF et il semble que le mécanisme d'action du bFGF passe par son intermédiaire. En effet, l'utilisation d'un anticorps bloquant contre $\alpha_v\beta_3$ (LM609) stoppe l'angiogenèse induite par le bFGF, ceci de manière spécifique puisque celle induite par le VEGF n'est pas affectée, réciproquement pour $\alpha_v\beta_5$ et VEGF [66].

Les anticorps bloquants ou les peptides cycliques contenant la séquence RGD et spécifiques de $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ sont capables de bloquer l'angiogenèse induite par le bFGF, le $\text{TNF}\alpha$ ou de multiples tumeurs [30]. Les peptides RGD peuvent être liés à des molécules anti-tumorales ce qui permet une délivrance localisée de ces substances aux régions les plus riches en intégrines, donc les néovaisseaux tumoraux [5].

Stromblad et coll. suggèrent que les intégrines puissent transmettre un signal de survie cellulaire via le blocage de l'activation de la p53, et leur interaction avec les protéines de la matrice extracellulaire est de ce fait cruciale à la survie des cellules endothéliales [179].

2. Le système des protéases de la matrice extracellulaire

a) Les métalloprotéinases

La membrane basale est un support pour certaines structures cellulaires et permet une compartimentation anatomique. Le tissu interstitiel adjacent se compose de : fibres de collagène, de protéoglycanes et de glycoprotéines. Des enzymes protéolytiques sont directement responsables de la dégradation et de la réorganisation de cette matrice dans les processus de renouvellement tissulaire : les métalloprotéinases de la matrice (MMP), les sérines protéases (activatrice du plasminogène), les cystéines protéases (cathepsine B et L) et les aspartyl protéases (cathepsine D).

Les MMP constituent une famille de protéases appartenant à la superfamille des endoprotéinases à doigts de zinc. Elles sont capables de dégrader tous les composants de la matrice extra-cellulaire. Plus de 20 protéines différentes ont été décrites chez l'homme, dont la plupart sont sécrétées et quelques-unes associées à la membrane cellulaire. Les MMP sont sécrétées sous une forme inactive : le clivage de la cystéine bloquant le site actif constitué par l'atome de zinc permet l'activation de l'enzyme.

Les collagénases (MMP-1, -3 et -13) coupent les collagènes de type I, II et III sous leur forme fibrillaire native. Les stromélysines-1 et -2 (MMP-3 et -10) ont un large panel de substrats contrairement à la stromélysine-3 (MMP-11) dont la fonction se limite à la libération des facteurs de croissance séquestrés par la matrice. Les gélatinases A (MMP-2) et B (MMP-9) dégradent le collagène dénaturé et les composants de la membrane basale. La matrilysine (MMP-7) coupe le collagène de type I, II, IV et V, la fibronectine et la pro-collagénase-1. Il existe 5 protéines de la famille qui restent liées à la membrane cellulaire (MT-MMP). Elles ont un rôle d'activation des pro-MMPs en même temps que de remodelage de la matrice.

L'expression de MMP-2 et de MT1-MMP, les MMP les plus généralement impliquées dans l'angiogenèse, corrèle avec la progression tumorale de gliomes, tumeurs fortement vascularisées [104]. La liaison de $\alpha v \beta 3$ à la MMP-2, liaison spécifique, entraîne une

augmentation de l'activité de l'enzyme, elle-même nécessaire à la néovascularisation. Ceci pourrait expliquer pourquoi le blocage de $\alpha v \beta 3$ inhibe l'activité de bFGF in vitro [30].

L'uPA est une sérine protéase qui catalyse spécifiquement la formation de la plasmine à partir du plasminogène. La plasmine est une enzyme à activité trypsine capable de cliver un large panel de molécules, du fibrinogène en fibrine aux facteurs de la coagulation, en passant par les formes latentes du TGF- β , le VEGF et les autres facteurs séquestrés dans la matrice, ainsi que les pro-MMP. L'activation de l'uPA résulte de l'action de la plasmine (boucle d'amplification), ou des trypsines et des cathepsines associées aux cellules tumorales ou encore de la thrombospondine-1. L'uPA possède un récepteur de haute affinité qui augmente son efficacité de clivage. Ce récepteur est situé sur les cellules endothéliales, les leucocytes, les kératinocytes et les cellules musculaires lisses et il agit également comme une molécule d'adhésion qui transmet un signal de chémoattraction vers la cellule qui le porte. Ce signal induit également l'expression de la cathepsine B et de MMP-9 [120].

b) Les inhibiteurs des métalloprotéinases

Les inhibiteurs physiologiques des MMP comprennent les TIMPs ainsi que l' $\alpha 2$ -macroglobuline. L' $\alpha 2$ -macroglobuline est une protéine produite par le foie. C'est un inhibiteur non-spécifique des 4 classes de protéases et elle agit par capture de ces enzymes.

Les TIMP sont beaucoup plus spécifiques des MMP : il existe 4 membres de cette famille, synthétisés par les macrophages, les fibroblastes et les ostéoblastes. L'association entre les MMP et les TIMP semble intervenir après sécrétion des protéines : elle aboutit à des complexes bloquant le site actif des MMP. Toutefois, la liaison progélatinase-A/TIMP-2 permet au complexe de se lier à MT1-MMP qui va alors être en mesure d'activer la gélatinase A, ce qui va entraîner une cascade d'activation des MMP : TIMP-2 favorise alors l'activation des MMP [104].

La MMP-2 est fonctionnellement associée à $\alpha v \beta 3$: sa liaison à ce récepteur est indispensable pour assurer le fonctionnement correct de l'enzyme. Un fragment de la MMP-2, appelé PEX pour C-terminal hemopexin-like domain, est naturellement présent dans certaines situations pathologiques (rétinopathie de prématurité) et il agit comme un inhibiteur compétitif de la MMP-2 pour la liaison à $\alpha v \beta 3$, d'où une inhibition de son activité collagénase. Ceci suggère qu'il puisse s'agir d'un inhibiteur naturel de la néovascularisation [31].

Il faut noter que, parallèlement à leur potentialité angiostatique, les TIMP ont également un effet biologique propre de potentialisation de la prolifération cellulaire et d'inhibition de l'apoptose [188]. Cette double caractéristique limite l'éventualité de leur utilisation thérapeutique, de concert avec la durée de vie très limitée de la protéine recombinante in vivo [26]. Toutefois, on peut noter des situations physiologiques où les TIMP jouent un rôle sans doute non négligeable, notamment durant la phase d'involution des hémangiomes de l'enfant [182].

c) L'angiostatine et l'endostatine

L'observation clinique que, dans certains cancers, le retrait de la tumeur primaire entraînait une flambée des métastases dormantes, incita à rechercher l'existence d'un facteur tumoral circulant qui inhiberait la croissance des métastases. Le premier facteur de ce type découvert fut l'angiostatine issue du clivage protéolytique du plasminogène : c'est un fragment interne du plasminogène de 38 kDa qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse dans certaines tumeurs murines in vivo [138]. L'angiostatine est en particulier capable d'inhiber la croissance d'une tumeur primaire d'origine endothéliale (EOMA) et les complications hématologiques liées à ce type de tumeur (thrombocytopénie, anémie, coagulopathie) [105]. C'est un facteur de croissance issu de la tumeur, le GM-CSF, qui induit la MMP-12 ou élastase macrophagique, protéase responsable du clivage du plasminogène [58]. D'autres molécules telles que les sérines protéases et d'autres MMP (-2, -3, -7, -9) sont également capable d'induire ce clivage [151].

L'endostatine est un fragment de 20 kDa du collagène XVIII, protéine localisée autour des vaisseaux. Tout comme l'angiostatine, elle est capable de faire régresser des tumeurs primaires et de maintenir des métastases à l'état quiescent [139]. Elle semble affecter le ratio bcl2/bax et induit l'apoptose spécifique des cellules endothéliales [56]. La protéase responsable du clivage du collagène n'est pas identifiée pour le moment.

Il est intéressant de noter que les MMP, généralement considérées comme pro-angiogéniques, jouent également un rôle majeur dans la génération de ces médiateurs antiangiogéniques.

3. Les thrombospondines (TSP)

Il s'agit en réalité d'une famille de glycoprotéines extracellulaires de la matrice, trimériques ou pentamériques. Cette famille comporte 5 membres, ostéopontine, ténascine C, Sparc, et enfin les thrombospondines TSP1 et TSP2, qui bloquent la croissance et la migration des cellules endothéliales. Leur poids moléculaire varie entre 420 et 520 kDa. Comme le rappellent Bornstein et coll., ces protéines agissent comme des adaptateurs et modulateurs des interactions avec la matrice extracellulaire : elles sont capables d'interagir avec de nombreux récepteurs de la surface cellulaire, de lier et d'activer des cytokines, d'inhiber les effets de certains facteurs de croissance et enfin d'agir comme inhibiteurs compétitifs de certaines protéases. Les TSP1 et TSP2 possèdent une forte homologie structurale et leur activité anti-angiogénique est limitée à la région centrale de la protéine. On pensait tout d'abord qu'il n'existait qu'une seule TSP, la TSP-1 : les anticorps utilisés dans les premiers travaux ne permettaient pas de différencier entre TSP-1 et -2. Elles sont synthétisées par de nombreuses cellules (macrophages, monocytes, plaquettes, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, cellules épithéliales, fibroblastes...) [44].

Les TSP sont capables de se lier aux protéoglycanes, aux récepteurs de lipoprotéines de faible densité ainsi qu'à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. TSP2 inhibe l'activité du bFGF dans un modèle de vascularisation cornéenne et la formation d'un réseau vasculaire à partir de cellules aortiques bovines [27]. La TSP-1 pourrait également interagir avec le bFGF et empêcher la liaison de ce dernier à son récepteur [192]. Il a également été suggéré que la TSP-1 activerait le TGF β latent, ce qui inhiberait secondairement la prolifération des cellules endothéliales [164]. Un troisième mécanisme a été proposé où la TSP-1 induirait directement l'apoptose des cellules endothéliales [74]. Les souris déficientes pour le gène de TSP2 présentent un phénotype particulier avec une augmentation de la densité vasculaire au niveau de la peau [102]. De plus, la transfection de l'ADNc codant pour la thrombospondine dans une lignée de cellules endothéliales transformées par un polyoma virus oncogène restaure le phénotype normal des cellules et empêche la formation de tumeur chez la souris nude [170].

La régulation de l'expression de TSP-1 passe par l'activité de la protéine p53 : l'expression de la p53 sauvage régule positivement les séquences promotrices du gène de TSP-1. Lors de la perte d'hétérozygotie survenant fréquemment dans les tumeurs et aboutissant à une inactivation de la p53, l'expression de TSP-1 est inhibée, favorisant le passage vers un stade

tumoral angiogénique [50]. En effet, une diminution de l'expression de TSP-1 est notée dans le cancer du sein et les observations de Weinstat et coll. indiquent que les fibroblastes du stroma produisent de la TSP-1 pour circonscrire la tumeur et inhiber l'angiogenèse [197].

III. L'angiogenèse : insuffisances et excès

Comme nous venons de le voir, l'angiogenèse est un mécanisme très finement régulé à l'état physiologique. Dès qu'un déséquilibre survient au niveau d'un facteur régulateur (insuffisance ou excès de production), et s'il n'est pas compensé très rapidement, l'évolution vers une situation pathologique est fortement probable. Nous allons décrire maintenant les principales maladies impliquant des anomalies de l'angiogenèse. Nous évoquerons également les situations où l'intensité de la vascularisation peut être considérée comme un facteur pronostique d'évolution de la maladie.

A. Les anomalies de la cicatrisation

1. Physiologie de la cicatrisation

A la suite d'une plaie, les capillaires qui envahissent le bouchon de fibrine sont une des composantes majeures du tissu de granulation car ce sont eux qui délivrent à la fois les nutriments, les cellules inflammatoires et l'oxygène nécessaires à la cicatrisation. De plus, leur importance est capitale pour permettre l'évacuation des débris nécrotiques, préalable à la reconstruction cellulaire. Il a été montré par Broadley et coll. que l'utilisation d'anticorps anti-bFGF diminue fortement la formation du tissu de granulation in vivo [28].

En effet, on retrouve une grande quantité de bFGF in situ pendant les 24 premières heures ce qui est la conséquence de 2 phénomènes : les plaquettes sanguines accumulées dans le bouchon de fibrine libèrent une grande quantité de bFGF et les protéases libèrent le bFGF séquestré dans la matrice extracellulaire [15]. Initialement l'infiltration par des neutrophiles est massive : leur fonction principale est la phagocytose des débris, mais ils sécrètent également des facteurs tels que IL-1, TNF α et VEGF [67]. Puis dans les 24-48 heures, les macrophages et les lymphocytes deviennent majoritaires. Les macrophages sécrètent des facteurs pro-angiogéniques sous l'influence du lactate et de l'hypoxie cellulaire, mais également des facteurs de dégradation de la matrice et des stimulants des fibroblastes et des kératinocytes [113].

Le bFGF est ensuite relayé par le VEGF, dont le pic est observé à 7 jours. Il provient des kératinocytes, macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie.

2. Anomalies liées au diabète

Dans le modèle des souris mutantes db/db mimant un diabète à l'âge adulte, on constate que les animaux malades expriment l'angiopoïétine-2 après une blessure de manière disproportionnée à la fois en quantité et dans le temps, alors que sa concentration décroît rapidement chez les animaux sains [91]. Dans ce modèle, on constate également une diminution de l'expression de Tie-2, ce qui ne fait qu'amplifier le mécanisme. Or ce déséquilibre s'accompagne également d'un défaut de production de VEGF [32]. Comme nous l'avons évoqué auparavant, la sur-expression de l'angiopoïétine-2 associée à une carence en VEGF aboutit à la régression des vaisseaux et donc à une cicatrisation incomplète.

3. Les ulcères

Les ulcères diffèrent à la fois au niveau de leur localisation anatomique (dermique, gastrique et intestinal...) et de leur origine étiologique. Pourtant les mécanismes de leur réparation sont très similaires : elle est initiée par la sécrétion de facteurs de croissance qui induisent la formation du tissu de granulation et la différenciation des cellules des marges de l'ulcère ; puis les cellules épithéliales migrent et l'ulcère se contracte (phase précoce de la cicatrisation). Enfin, le tissu de granulation est remodelé et infiltré par des néovaisseaux (phase tardive). En dernier lieu, la ré-épithélialisation est complète et les glandes sont reconstruites (phase de reconstruction) [163].

L'étude histologique des ulcères duodénaux montre, chez l'homme comme chez l'animal, la présence de débris cellulaires nécrotiques, de cellules inflammatoires et de tissu de granulation. Ce dernier se compose de vaisseaux sanguins, de monocytes et de fibroblastes. La thérapie usuelle de ces ulcères passe par la neutralisation de l'acidité gastrique, notamment par la cimétidine, mécanisme efficace surtout pendant la phase précoce de la cicatrisation.

La stimulation de l'angiogenèse au stade tardif de la cicatrisation est un potentiel majeur d'accélération du processus. L'administration de bFGF par voie orale chez le rat, sous une forme modifiée résistante au pH acide, augmente fortement l'angiogenèse au niveau de l'ulcère sans modifier la vascularisation du tissu sain périphérique. L'augmentation de cette angiogenèse est corrélée à une cicatrisation plus rapide de l'ulcère, ceci dans des conditions où le pH de l'estomac n'est pas modifié [64,181]. Avec le fait que le bFGF absorbé oralement n'est pas retrouvé au niveau circulatoire et qu'aucun effet systémique n'a été retrouvé, ceci

suggère que le bFGF pourrait intervenir dans le traitement de ce type d'ulcère, seul ou en association avec les anti-acides.

En ce qui concerne les ulcères dermiques, l'application de aFGF, mitogène pour de nombreuses cellules impliquées dans la cicatrisation (fibroblastes, cellules endothéliales, kératinocytes), accélère la guérison d'ulcères chez la souris mutante db/db de phénotype diabétique analogue au diabète de type II chez l'homme (surface ulcérée 12 fois moins importante à 2 semaines comparée au groupe contrôle) [121]. Dans un autre modèle, chez le lapin, où le déficit de cicatrisation est dû à une ischémie, l'utilisation de PDGF-BB ou de TGF β 1 plus ou moins associés avec de l'

transendothéliale des cellules T qui serait responsable du défaut d'expression du VEGF. La réponse de ces animaux au VEGF recombinant est comparable à celle observée chez le jeune.

b) Cardiaque

La maladie des artères coronaires est une cause majeure de morbidité et de mortalité dans les pays développés. L'établissement de cette maladie est progressif : à mesure que des plaques d'athérome se forment dans les artères, le tissu cardiaque souffre, les cellules meurent par apoptose ou nécrose, et l'atrophie musculaire myocardique s'installe, génératrice d'hyposystolie et d'insuffisance cardiaque. La thérapeutique classique se base sur la prévention, puis une fois les troubles avérés sur une revascularisation mécanique par angioplastie ou chirurgie. Le succès des interventions dépend du stade de l'occlusion artérielle et de l'état général du patient. La fréquence des symptômes résiduels est importante.

Webster rapporte l'efficacité exceptionnelle du HGF lorsqu'il est transfecté par plasmide nu, dans les expériences d'Aoki et coll. sur l'infarctus du myocarde chez le rat [194].

2. Athérosclérose

L'athérosclérose est un phénomène associé au dépôt de lipides, principalement des cholestérides, dans la paroi artérielle aboutissant à des plaques appelées plaques d'athérome. Ces dépôts entraînent le développement d'une réaction inflammatoire, associée à la prolifération des vasa vasorum, microvaisseaux de la paroi des artères de gros diamètre, et à une fibrose secondaire, d'où le terme d'athérosclérose. Les régimes hypocholestérolémiants provoquent une régression des plaques d'athérome, et entraînent parallèlement une réduction importante du flux sanguin à travers les vasa vasorum de l'intima et de la média des vaisseaux coronaires [198], ce qui confirme le rôle étiologique des dépôts lipidiques dans la prolifération de ces microvaisseaux. Par ailleurs, on peut remarquer que l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiogenèse (endostatine, TNP-470) chez la souris hypercholestérolémique, montre une réduction, respectivement de 85 et 70 %, de la surface moyenne des plaques d'athérome [131]. Ceci suggère que l'inhibition de l'angiogénèse permet de limiter l'extension des plaques d'athérome même en présence d'un taux important de lipides circulants, et donc, à fortiori, on peut supposer l'existence d'un probable effet cumulatif entre le régime hypocholestérolémiant et la thérapeutique anti-angiogénique dans cette indication.

L'expression des aFGF et bFGF est augmentée dans les artères des patients atteints d'athérosclérose, le aFGF étant plus spécifiquement impliqué au niveau des lésions établies : le bFGF interviendrait dans les phases précoces de la maladie contrairement au aFGF dans les phases tardives [29]. L'administration de aFGF (par l'intermédiaire du transfert du gène, légèrement modifié pour être sécrété) au niveau artériel chez le porc a permis de mettre en évidence l'épaississement de l'intima et la formation en son sein de néocapillaires [132]. Ce phénomène laisse penser que le aFGF pourrait donc être un élément majeur dans le développement des plaques d'athérosclérose.

La néovascularisation des plaques d'athérosclérose pourrait être également le résultat d'une surexpression de VEGF et d'une hypoxie locale : elle peut contribuer à la croissance et à la rupture de la plaque directement [41] ou indirectement via le déséquilibre de la balance angiogenèse/anti-angiogenèse qui en résulte. Par exemple, la présence anormale de métalloprotéinases (MMP-1, -9, et -3 sécrétées par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages), a été retrouvée au sein des plaques. Or le collagène de type I, particulièrement sensible à MMP-1, est la forme prédominante au sein de ces mêmes plaques d'où leur probable fragilisation [85]. De fait, la vascularisation des plaques est fortement associée à l'importance des hémorragies intra-plaques, à leur instabilité et l'émergence d'une symptomatologie de la maladie occlusive des artères [128]. MMP-1 favorise également la migration des cellules musculaires lisses de la media vers l'intima, initiant ainsi les lésions de sténose amplifiant l'effet occlusif des dépôts lipidiques [85].

3. Maladies vasculaires de l'œil

Le VEGF est produit par de multiples cellules de l'œil : cellules endothéliales rétinienne, les péricytes, les cellules gliales, les cellules ganglionnaires, les cellules épithéliales rétinienne et les leucocytes infiltrants. La surexpression du VEGF suffit à induire une néovascularisation mimant les maladies ischémiques de l'œil, et on en retrouve une concentration élevée chez les patients lors des épisodes actifs de ces maladies [201]. L'utilisation d'oligonucléotides anti-sens contre le VEGF inhibe la néovascularisation dans le modèle d'ischémie induite par l'oxygène [153].

Le bFGF et l'IL-8 sont également produits dans l'œil par les cellules endothéliales rétinienne et les cellules gliales, ainsi que les cellules épithéliales rétinienne pour le bFGF. Tout comme

le VEGF, le bFGF et l'IL-8 sont présents dans le vitré des patients atteints de rétinopathie diabétique et maculaire liée à l'âge [201]. Toutefois, des souris KO pour le bFGF présentent les mêmes symptômes que des souris sauvages dans le modèle de néovascularisation liée à l'oxygène [141] ce qui incite à relativiser l'implication causale de ce facteur dans les rétinopathies vasculaires.

a) La néovascularisation cornéenne

De nombreux stimuli entraînent la néovascularisation de la cornée, de l'hypoxie à la destruction des cellules souches du limbe. L'inflammation, qu'elle soit stérile (lentilles de contact, brûlures chimiques) ou d'origine infectieuse (trachome), est fréquemment associée à cette néovascularisation : l'afflux de cellules inflammatoires entraîne une hypoxie dans cet environnement usuellement acellulaire. Comme le rappellent Adamis et coll., le VEGF pourrait jouer un rôle important dans ces phénomènes [2].

Les vaisseaux anormaux sont associés à un épithélium anormal qui ne possède pas les propriétés optiques de l'épithélium cornéen normal, ce qui aboutit à une perte de vision. La photo-coagulation des vaisseaux entraîne la réversion du phénotype de l'épithélium vers la normale. D'autre part, il se produit un dépôt de lipides dans le stroma cornéen à partir de ces très fragiles néovaisseaux, ce qui obstrue également la vision. Lorsque le processus est avancé, on observe également des vaisseaux dirigés vers le centre de la cornée et obstruant directement le passage de la lumière vers la rétine.

b) La néovascularisation de l'iris

Elle se produit généralement suite à une ischémie rétinienne : elle est associée aux obstructions des veines rétiniennes, aux rétinopathies diabétiques et aux tumeurs intraoculaires angiogéniques (du type rétinoblastome).

La partie antérieure de l'iris est avasculaire : l'observation des vaisseaux se fait par angiographie à la fluorescéine, ce qui révèle des vaisseaux tortueux et fragiles. La multiplication de ces vaisseaux conduit à l'occlusion du réseau trabéculaire, empêchant l'évacuation normale du liquide intraoculaire et aboutissant au glaucome. Le VEGF a clairement été établi comme nécessaire et suffisant à l'établissement de cette néovascularisation dans un modèle de singe, et confirmé chez l'homme [2].

c) Les rétinopathies

La vascularisation de la rétine peut être intra- ou extra-rétinienne. Pour cette dernière, les vaisseaux croissent de la face interne de la rétine vers la face en contact avec le vitré. Les nouveaux vaisseaux perdent leur agencement régulier, ils sont tortueux et dilatés. Les vaisseaux intra-rétiniens n'atteignent pas la surface avasculaire du vitré et sont moins sujets à des fuites de liquide. Ces vaisseaux sont aussi appelés anomalies microvasculaires intra-rétiniennes (intra-retinal microvascular abnormalities = IRMA).

Lors de l'évolution de la maladie, du tissu fibreux se dépose à proximité des vaisseaux, contribuant à la formation d'adhérences exerçant des tractions sur la rétine, avec décollements et hémorragies.

L'hormone de croissance et l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ont été impliqués par Smith et coll. dans la néovascularisation rétinienne faisant suite à une période d'ischémie, ce qui suggère que l'inhibition de ces deux facteurs puissent être utile dans la prévention de cette maladie [174].

(1) rétinopathie de prématurité

Elle se manifeste chez les nouveau-nés prématurés lorsque la rétine est incomplètement vascularisée au moment de la naissance. Des vaisseaux anormaux se développent alors à la jonction entre les parties vasculaire et avasculaire de la rétine [125].

(2) rétinopathie diabétique

(a) Physiopathologie des lésions associées au diabète [97]

Les complications du diabète concernent de nombreux tissus, aussi bien le tissu nerveux que la rétine, les reins ou le cœur. Dans tous les cas, la cause majeure de la lésion est liée à un défaut touchant leur vascularisation. La normalisation de la glycémie grâce à l'insuline permet de prévenir les lésions microvasculaires et les neuropathies mais pas les altérations des artères coronaires ou périphériques.

Un des mécanismes impliqué est la formation de composés appelés AGEs (advanced glycation endproducts) qui sont des protéines anormalement glycosylées : ils sont responsables de l'altération du bFGF qui diminue son activité mitogénique de plus de 70 %, d'une modification de la laminine empêchant sa polymérisation et sa capacité de liaison aux HSPG, et de la modification de la structure du collagène de type IV. Ces altérations sont

responsables d'une diminution d'élasticité des gros vaisseaux et de la perte de leur capacité de vasodilatation en réponse au NO.

L'hyperglycémie entraîne une activation quasi constitutive de la PKC, d'où la formation de DAG qui intervient au niveau de l'expression des gènes des protéines contractiles, ce qui altère donc les capacités contractiles et de régulation du flux sanguin par les cellules musculaires lisses. L'inhibition de la PKC rétablit la perfusion normale de la rétine (mais les inhibiteurs de la PKC ont un spectre trop large et de nombreux effets secondaires).

(b) Cas de la rétine

Les premières altérations concernent la structure de la membrane basale des capillaires, qui s'épaissit et dont la proportion de protéoglycanes diminue, modifiant le métabolisme des cellules vasculaires et notamment leurs capacités d'adhésion et de migration. Au niveau de la rétine la diminution du nombre de péricytes est particulièrement flagrante, passant d'un rapport 1:1 avec les cellules endothéliales à un rapport 1:10.

Les microvaisseaux perdent l'apparence de vaisseaux normaux avec l'apparition de microanévrismes, des vaisseaux tortueux et en boucle, puis des hémorragies. L'obstruction des capillaires crée des zones d'ischémie : c'est la phase dite non proliférative. Quand l'occlusion est plus prononcée ou touche les capillaires centraux, elle induit hémorragies, œdème, exsudats suivis de la prolifération de néovaisseaux à partir des veinules existantes (phase proliférative), puis de la cécité.

En absence de normalisation de la glycémie, on observe une rétinopathie, plus ou moins prononcée, chez 100% des individus atteints de diabète après une quinzaine d'années d'évolution.

L'abondance de leucocytes dans les vaisseaux rétiens (plus nombreux chez les diabétiques que chez les sujets sains) pourrait contribuer à l'absence de perfusion capillaire aboutissant à l'ischémie. En effet, plusieurs anomalies chez le sujet diabétique ont été décrites et pourraient intervenir ici : une diminution de la plasticité des leucocytes, associée à une hyper-expression de la molécule d'adhésion ICAM-1 dans la microvascularisation rétinienne, et à un nombre accru de plaquettes, pourraient expliquer l'obstruction des vaisseaux par les leucocytes [2].

Le VEGF est, dans ce cas aussi, le candidat thérapeutique idéal : l'utilisation de récepteurs solubles neutralisants dans des modèles précliniques a montré une efficacité certaine sur la

néovascularisation rétinienne. Le blocage des intégrines a également un avenir prometteur [51].

Dans le vitré, la fraction active du TGF β , composé anti-angiogénique dans l'œil, est fortement diminuée (de 30 à 70 %) pendant les épisodes de rétinopathie proliférative [146].

d) La néovascularisation choroïdienne

Appelée aussi dégénérescence maculaire liée à l'âge, c'est une des causes majeures de perte de la vue chez les personnes de plus de 65 ans. La néovascularisation se développe à partir des vaisseaux choroïdiens et s'étend vers la macula, zone centrale de la vision. La perméabilité vasculaire augmente, d'où l'extravasation de liquide et un œdème responsable de la perte de vision suite à la mort des photorécepteurs centraux. La fragilité des néovaisseaux est également responsable des hémorragies fréquentes dans le vitré et de la rétraction fibrotique qui peut induire des tractions et le décollement de la rétine.

Seulement 15% des patients sont des candidats potentiels pour l'ablation des vaisseaux choroïdiens au laser et cette technique n'obtient que 50% de succès. Cette maladie est mal connue en raison du caractère assez inadéquat des modèles animaux. Comme le rappellent Adamis et coll., l'expression du VEGF et des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$ corrèle avec la survenue de la maladie mais aucune expérience de blocage n'a encore été réalisée [2].

L'expression de certains sous-types de récepteurs de la somatostatine a été retrouvée au niveau de la choroïde des individus sains et également dans les stades précoces de dégénérescence maculaire liée à l'âge [103]. L'utilisation d'analogues synthétiques de la somatostatine pourrait donc être envisagée dans ce type d'affection.

C. Les inflammations chroniques

Il existe une interdépendance entre les phénomènes inflammatoires et angiogéniques. On peut observer dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques la présence de médiateurs pro-angiogéniques. L'utilisation des thérapeutiques anti-inflammatoires classiques dans ces situations inhibe l'angiogenèse dans un grand nombre de cas (stéroïdes, anti-prostaglandines...).

1. Polyarthrite rhumatoïde

On assiste à l'invasion de l'articulation par de nombreux vaisseaux (formation d'un pannus) et à la dégradation du cartilage par le processus protéolytique impliqué dans la néoangiogenèse [16]. Les macrophages isolés à partir du liquide synovial de patients atteints par cette maladie produisent des facteurs pro-angiogéniques [99].

2. Psoriasis

Le psoriasis est une maladie de la peau caractérisée par une hyperprolifération des kératinocytes de l'épiderme, une inflammation et une angiogenèse excessive au niveau du derme. Elle est la conséquence de prédispositions génétiques associées à des facteurs déclenchant environnementaux. Plusieurs dysrégulations sont impliquées : la surexpression d'IL-8, localisée au niveau des kératinocytes de l'épiderme, et un défaut de production de thrombospondin-1, le tout aboutissant à un environnement pro-angiogénique [134].

3. Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Il s'agit des différentes formes de la maladie de Crohn et des colites ulcéreuses, c'est à dire des inflammations chroniques des muqueuses intestinales d'étiologie inconnue, comprenant des ulcérations et une fibrose plus ou moins profonde. Une microcirculation anormale est un des éléments suspectés d'intervenir dans la pathogenèse de la maladie. Des niveaux anormaux d'expression de VEGF et de bFGF sérique ont été retrouvés chez des patients atteints par cette maladie [92], ainsi qu'une production de bFGF in situ fortement accrue par rapport aux individus sains [186]. Les MMP-1 et -9, provenant des péricytes entourant les veinules, sont également présentes à proximité des ulcères et sont suspectées de jouer un rôle important dans leur formation [8]. D'autres MMP sont également suspectées d'intervenir dans les mécanismes réparateurs des ulcères (MMP-1, -3, -7, -10 et -13) [8]. Pour le moment, les mécanismes liés à l'établissement de cette maladie sont encore mal connus et aucun essai thérapeutique d'anti-angiogenèse n'est à l'étude.

4. Fibrose pulmonaire idiopathique

Il s'agit d'une fibroplasie chronique dont l'issue est souvent fatale, 4 à 5 ans après l'apparition des premiers symptômes. Le mécanisme qui aboutit à la fibrose inclut une néovascularisation et des remaniements vasculaires incontrôlés, suivis par une prolifération fibroblastique avec

des dépôts de matrice extracellulaire aboutissant à la perte de la fonction pulmonaire. Le fluide issu de lavage broncho-pulmonaire de patients atteints présente une forte concentration en IL-8 et une diminution de la quantité d'IL-10 [94]. Un modèle murin a récemment confirmé l'implication des chémokines dans cette maladie [95].

Il existe un déficit de production d'IFN γ dans cette maladie et des essais cliniques préliminaires d'administration d'IFN γ -1b associés à de la prednisolone ont montré une amélioration de la fonction pulmonaire chez les patients traités pendant 1 an. Toutefois, on ne peut pas, au vu des résultats, affirmer que cette amélioration est liée à l'angiogenèse puisque l'IFN γ bloque également la synthèse du collagène I et III, du TGF β 1 et du facteur de croissance du tissu conjonctif [208].

D. Les tumeurs

1. Historique et généralités

Folkman a émis l'hypothèse en 1971 que la croissance et le processus métastatique des tumeurs étaient des phénomènes directement dépendants de la vascularisation. Depuis, le réseau vasculaire tumoral est devenu une cible thérapeutique potentielle dont l'étude a été privilégiée. L'affirmation de Folkman découle de l'observation qu'en l'absence de néovascularisation, la taille des tumeurs reste en deçà de quelques millimètres de diamètre. Chaplin et Dougherty rappellent que l'idée d'interrompre la vascularisation pour traiter les tumeurs remonte à 1844 quand Walsh écrivit que certaines tumeurs pouvaient être traitées par thrombose ou torsion de leur pédicule vasculaire principal [42].

Lorsqu'une tumeur apparaît, elle est tout d'abord avasculaire. Parfois, à un certain moment, il se produit en son sein un changement brutal d'un phénotype non-angiogénique vers un phénotype angiogénique : le premier correspond à un stade où la tumeur évolue lentement avec des cellules endothéliales avoisinantes quasi-quiescentes, alors que le phénotype angiogénique comporte une production décuplée de facteurs de croissance endothéliaux, et se manifeste par une croissance tumorale rapide et l'initiation du processus métastatique. Le gène suppresseur de tumeur p53 joue probablement un rôle important dans cette évolution : la perte de ce gène (mutation, délétion) s'accompagne d'une diminution de l'expression de la thrombospondine-1 [50] et d'une augmentation de l'expression de VEGF, alors que sa

restauration inhibe l'angiogenèse dans de nombreux modèles tumoraux [204]. D'autres molécules du contrôle de l'homéostasie cellulaire, notamment certains oncogènes cellulaires, interviennent dans l'expression de facteurs pro-angiogéniques. Les virus peuvent aussi parfois expliquer le pourquoi du changement phénotypique : par exemple, le Human Kaposi's Sarcoma Herpes Virus-G Protein-Coupled Receptor (KSHV-GPCR) a été impliqué dans l'émergence du sarcome de Kaposi chez l'homme. Il existe en effet une forte homologie de séquence entre cette molécule virale et le récepteur CXCR2 (récepteur des chémokines pro-angiogéniques) [34]. Le récepteur viral possède une activité constitutive capable d'induire la transformation oncogénique de la lignée NIH 3T3 et de favoriser l'angiogenèse in vivo. Une mutation ponctuelle de CXCR2 ou la présence continue des chémokines stimulatrices de ce récepteur suffit à reproduire les effets de KSHV-GPCR. Cette molécule est donc susceptible de dérégler la balance de l'angiogenèse en faveur d'un stade pro-angiogénique.

L'utilisation d'une thérapie anti-angiogénique dans le traitement du cancer présente de nombreux avantages comparés à la chimiothérapie classique :

- Un large spectre d'activité : l'endothélium tumoral semble distinct de l'endothélium présent dans les tissus normaux mais on constate une forte homologie entre ceux issus de différentes tumeurs [178].
- Une diminution des risques liés à l'émergence d'une chimiorésistance : l'échappement des tumeurs aux drogues est lié à leur instabilité génétique qui favorise l'émergence de clones de cellules résistantes. Les cellules de l'endothélium, qui, à contrario, sont stables génétiquement, devraient développer une résistance plus lentement ou même pas du tout.
- Une bonne accessibilité des cellules cibles permettant l'utilisation de traitements par voie systémique : la pénétration jusqu'aux cellules tumorales peut parfois être sub-optimale alors qu'elle est toujours parfaite concernant les cellules endothéliales.
- Des effets secondaires plus limités : en effet, les traitements sont plutôt à visée cytostatique que cytotoxique.

On pourrait arguer que la diminution de la vascularisation intra-tumorale est susceptible d'isoler la tumeur, et de ce fait de diminuer l'accès des drogues chimiothérapeutiques vers leurs cibles. Or, paradoxalement, il a été montré que c'est la néovascularisation elle-même qui réduit graduellement l'accessibilité des drogues vers les cellules tumorales. En effet, les néovaisseaux sont peu résistants et le plasma passe facilement la barrière endothéliale : ceci

aboutit à une pression interstitielle très augmentée dans le tissu tumoral, et donc à l'écrasement des vaisseaux. Certaines thérapeutiques anti-angiogéniques sont donc favorables à la délivrance des drogues et peuvent être envisagées comme un traitement parallèle synergique de celles-ci [63].

2. Indices de vascularisation, médiateurs et pronostic

Les différentes études menées jusqu'à maintenant se révèlent souvent contradictoires sur l'aspect pronostique d'une vascularisation plus ou moins importante. Certains auteurs retrouvent une corrélation forte entre la densité microvasculaire (IMD, intra-tumoral microvascular density, mesuré par immunohistochimie) et le pronostic de la tumeur (agressivité locale et surtout phénomène métastatique), notamment dans le cancer du sein, cancer du poumon non à petites cellules, mélanome et cancer de la prostate, mais d'autres auteurs ne retrouvent pas de telle corrélation [195]. La variabilité inter-individuelle des expérimentateurs dans le dénombrement des vaisseaux, ainsi que la variété des anticorps révélateurs utilisés, jouent un rôle certainement non-négligeable.

Concernant le phénomène métastatique, la présence de vaisseaux au sein de la tumeur favorise l'extravasation des cellules tumorales et augmente donc le risque de dissémination, ce qui intervient dans le pronostic des tumeurs. La nature des vaisseaux intra-tumoraux, de par leur immaturité et leur fragilité, les rend plus perméables au passage de cellules tumorales : la simple pression interstitielle due à la croissance de la tumeur peut être suffisante. De plus, la sécrétion de protéases permettant la migration des cellules endothéliales favorise également celle des cellules tumorales. Certains agents anti-angiogéniques peuvent donc prévenir à la fois la vascularisation de la tumeur primaire et inhiber le passage de cellules invasives potentiellement métastatiques.

La présence de facteurs pro ou anti-angiogéniques au sein du tissu tumoral peut être révélée par immunohistochimie, par Western Blot, par Reverse Transcriptase et Polymerase Chain Reaction (RT-PCR transcription réverse et réaction de polymérisation en chaîne), ou par hybridation in situ des ARN messagers. Poon et coll. ont résumé un grand nombre d'études de la littérature (environ 200) [147] : ils ont retrouvé une association forte entre l'expression élevée du VEGF au sein de la tumeur et un grade tumoral avancé (ou une survie de courte durée). Les études concernant le bFGF sont moins concluantes avec quelques contre-exemples, comme l'étude de Colomer et coll. dans le cancer du sein : les effets du bFGF sur

des cellules non-endothéliales sont responsables de cet illogisme (induction d'une réponse fibroblastique autour de la tumeur, ce qui limite ses capacités d'invasion). Aucune conclusion formelle n'étant actuellement admise, nous n'entrerons pas dans les détails [147].

L'évaluation des facteurs circulants vis à vis du pronostic est également d'une importance majeure : en effet, une simple prise de sang peut permettre cette évaluation par test ELISA, ce qui est beaucoup moins invasif que l'exérèse chirurgicale ou la biopsie. Ceci peut permettre un suivi de l'évolution tumorale, et une estimation préopératoire de la gravité de la tumeur (d'où la modification possible de la prise en charge du patient). C'est une technique quantitative et reproductible, ce qui est incontestablement avantageux comparé à l'évaluation semi-quantitative par immunohistochimie. La grande majorité des études sur ce sujet ont retrouvé la corrélation positive entre la présence de VEGF circulant et la gravité de la maladie, les variations étant principalement liées au type histologique du cancer et à la puissance de l'étude [147].

Il est important de noter que le niveau de médiateurs pro-angiogéniques, s'il est important aux stades avancés de la tumeur, n'est que très faible au début de sa croissance : ce type de mesure n'est donc à priori pas utile pour la détection tumorale précoce. De même, son utilisation pour discriminer les tumeurs bénignes et malignes ne semble par appropriée [147]. Par contre, étant donné la diminution du VEGF circulant généralement observée après l'exérèse chirurgicale (la tumeur en étant la principale source), une persistance du facteur circulant ou une ré-augmentation après une chute initiale peut indiquer la récurrence du cancer. Ceci nécessite encore d'être étudié [147].

a) Carcinomes du poumon

Dans le cancer du poumon, les éléments permettant de définir le pronostic d'une tumeur sont assez rares. Il s'agit principalement du stade histologique, mais il existe une grande variabilité au sein d'un même stade : certaines tumeurs multicentriques et pourtant peu agressives, pourraient bénéficier d'un traitement chirurgical si on disposait d'un moyen de prévoir leur faible agressivité.

Le poumon est à la fois le site de tumeurs primaires (SCLC carcinomes pulmonaires à petites cellules, et NSCLC carcinomes pulmonaires non à petites cellules qui regroupent plusieurs types histologiques), et le site de nombreuses métastases, provenant notamment des cancers mammaires, gastro-intestinaux, urogénitaux, etc.... Aucun lien entre l'IMD dans les

adénocarcinomes pulmonaires et la survie n'a pu être mis en évidence, contrairement à ce qui est visible lorsqu'on observe les NSCLC dans leur ensemble [145]. Aucune corrélation ferme ne peut non plus être affirmée entre la présence de VEGF intra-tumoral et le pronostic, étant donné la variabilité des résultats publiés [147].

Certaines tumeurs, faiblement angiogéniques, peuvent également profiter du réseau vasculaire pulmonaire pré-existant et s'insérer au niveau alvéolaire : cette organisation, peu néovascularisée, est pourtant associée à un mauvais pronostic de survie [145].

Pour les métastases cliniquement détectables, Pezzella et coll. ont retrouvé un IMD élevé, mais ils signalent aussi l'existence de métastases dormantes, non-angiogéniques, qui trouvent dans le tissu pulmonaire le lieu idéal pour s'implanter : elles s'appuient sur la vascularisation normale et colonisent la place aisément accessible que représentent les alvéoles [145]. Les auteurs suggèrent que ce type de métastases puisse devenir de plus en plus fréquentes avec l'apparition des thérapeutiques anti-angiogéniques.

b) Carcinomes du tractus gastro-intestinal

Les études concernant les carcinomes du colon relient positivement l'IMD, la quantité de VEGF intra-tumoral et circulant à un pronostic défavorable. Les mêmes résultats sont retrouvés pour les tumeurs gastriques et les hépatocarcinomes [147]. Par exemple, Chung et coll. décrivent une récurrence hépatique des cancers du colon chez 66,7% des patients de leur étude présentant un marquage VEGF intra-tumoral positif, comparé à 16,7% seulement chez les patients négatifs ($p < 0,05$) [43].

c) Carcinomes du tractus urogénital et carcinomes mammaires

Weidner rapporte une série d'études concernant le pronostic des tumeurs du tractus urogénital [196]. Pour les carcinomes prostatiques, l'ensemble des études convergent pour conclure à un lien entre l'IMD et la gravité de la maladie (extension métastatique, grade tumoral, pronostic de survie). Mais pour l'instant, aucune corrélation n'a été établie formellement entre la présence de VEGF circulant et le grade tumoral [147]. Les carcinomes des testicules ont été peu étudiés et il n'a pas été mis en évidence non plus de lien entre vascularisation et pronostic [196].

En ce qui concerne les carcinomes de la vessie, l'IMD est un facteur de pronostic de survie indépendant du stade de la tumeur évalué par histologie [196]. Une diminution de la présence de thrombospondine-1 est un facteur prédictif des risques de rechute et de la survie globale, et une étude montre que la présence de VEGF circulant est un facteur pronostique de rechute post-chirurgie [147].

L'IMD dans le cancer du rein est significativement plus élevé chez les patients portant des métastases comparativement à ceux en rémission trois ans post-chirurgie. L'IMD est un facteur pronostic considéré comme majeur par la plupart des auteurs : pour Yoshino et coll., la survie est significativement plus élevée chez les patients présentant moins de 30 microvaisseaux par champs microscopique ($p=0,004$). Toutefois, MacLennan et coll. n'ont pas retrouvé cette corrélation chez les 97 patients de leur étude [196]. De même, le VEGF circulant n'a pas été démontré comme étant un facteur pronostique dans ce type de cancer [147].

L'implication pronostique du VEGF sérique pour les cancers ovariens n'a pas été formellement établie [147]. Par contre, dans les cancers du col de l'utérus, une corrélation forte existe entre l'IMD, l'invasion métastatique locale et la survie [196]. Ni le VEGF, ni le bFGF circulants n'ont été formellement reconnus comme des facteurs pronostiques de la survie dans les cancers mammaires [147], alors que l'IMD dans ces mêmes cancers était un facteur pronostique de meilleure qualité que le grade ou la taille de la tumeur [195].

d) Cancers hématologiques

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, l'angiogenèse est fortement impliquée dans la progression des cancers d'origine hématologique. Le nombre de microvaisseaux dans la moelle osseuse augmente chez les patients atteints de leucémie et, lors de leucémie aiguë myéloïde, le niveau élevé de VEGF circulant est un facteur pronostique défavorable sur la survie [147].

e) Sarcomes

De nombreux médiateurs pro-angiogéniques ont été décelés dans les sarcomes des tissus mous, dont les principaux représentants sont le VEGF, le aFGF et le bFGF. Une corrélation entre la densité microvasculaire au sein de la tumeur et l'expression de ces médiateurs aussi bien au site tumoral que dans le sang circulant a parfois été trouvée mais de façon non

IV. Essais thérapeutiques

La meilleure connaissance des mécanismes de l'angiogenèse pathologique incite aujourd'hui à des tentatives thérapeutiques dans ce domaine. Certaines difficultés, notamment liées à l'équilibre fragile existant au niveau des tissus sains et qui ne doit pas être perturbé, ralentissent l'expérimentation chez l'homme.

Pourtant, des essais thérapeutiques sont en cours : nous détaillerons tout d'abord les molécules candidates déjà physiologiquement impliquées dans la régulation de l'angiogenèse. Puis nous décrirons les inhibiteurs de ces médiateurs au niveau précoce (bloquant les interactions de type médiateur-récepteur, ou les signaux intracellulaires précoces), et au niveau tardif (altération au niveau de la transcription génique). Enfin, nous aborderons les molécules modifiant les caractéristiques de la matrice extra-cellulaire.

A. Difficultés méthodologiques des essais

1. Pro-angiogenèse

Il est relativement aisé techniquement de mettre en œuvre des essais de promotion de l'angiogenèse, même si la possibilité d'effets secondaires graves doit être prise en considération. Lorsque le risque encouru est important, les patients choisis dans les phases I des essais thérapeutiques sont alors souvent à des stades avancés de leur maladie. Dans le cas des molécules pro-angiogéniques, les risques d'athérosclérose accélérée, de génération de rétinopathies ou de réveil de tumeurs dormantes rendent ces traitements potentiellement dangereux. Les premiers patients inclus ont donc été ceux ayant une espérance de vie très limitée ou une qualité de vie extrêmement détériorée.

2. Anti-angiogenèse

La difficulté de ces études provient de la méthodologie employée dans les évaluations des drogues anticancéreuses : les critères de jugement classiquement employés ne s'adaptent que mal à ce nouveau type thérapeutique. En effet, le critère principal en phase II repose sur la réduction tumorale alors que ce qui est observé avec les traitements anti-angiogéniques relève plus de la stabilisation tumorale que de sa diminution. La comparaison à un traitement chimiothérapeutique de référence a peu de chances d'être concluant dans ces conditions.

En effet, les inhibiteurs de l'angiogenèse ont une activité cytostatique plutôt que cytolytique et donc très peu de réponses objectives sont observables dans des essais cliniques. La mesure de marqueurs tumoraux dans le sérum des patients a été suggérée mais la signification de ces résultats est difficilement extrapolable. De nombreux autres critères de substitution ont été proposés, le suivi de la densité vasculaire (impossible au vu du nombre de biopsies nécessaires au suivi), le dosage de facteurs de croissance circulants (pas toujours représentatif de la situation au site tumoral). Seuls des facteurs comme le temps avant rechute, la vitesse de croissance tumorale ou la survie sont véritablement significatifs.

L'idéal serait sans doute d'étudier des combinaisons thérapeutiques associant une chimiothérapie classique à un traitement anti-angiogénique pour observer une éventuelle synergie. Les essais devraient associer soit en même temps, soit à la suite, les thérapeutiques classiques et les inhibiteurs d'angiogenèse.

B. Composés physiologiques

1. Pro-angiogéniques

a) Protéines recombinantes

Dans le cas des ischémies myocardiques, plusieurs essais cliniques d'administration de protéines angiogéniques recombinantes (bFGF et VEGF) sont en cours avec des résultats mitigés. Le problème de la voie et de la cinétique d'administration est crucial : Les injections se font directement dans le myocarde ischémique, de manière intra-coronaire ou intraveineuse, ou par l'intermédiaire de microcapsules à libération prolongée implantées chirurgicalement, en association ou non avec les thérapeutiques chirurgicales habituelles.

b) Thérapie génique

Le transfert du gène du VEGF₁₆₅ et son expression intramusculaire favorise le développement de vaisseaux collatéraux chez des patients atteints d'ischémie sévère des membres et a permis de préserver plusieurs patients promis à une amputation [17]. Webster confirme que des essais récents réalisés par Holliman sur 55 patients vont dans le même sens [194].

Losordo et coll. ont utilisé l'injection intramyocardique isolée d'ADN nu codant pour VEGF₁₆₅ et pour les 5 patients traités, une amélioration de la vascularisation collatérale

mesurée par angiographie a été rapportée. De plus, la diminution de la fréquence des épisodes angineux, correspondant à une diminution de l'utilisation de nitroglycérine, a été constante [117]. Le même type de résultats a été obtenu grâce à l'utilisation d'un adénovirus recombinant pour VEGF₁₂₁ [156]. L'étude d'Holliman a également confirmé ces bons résultats pour l'ischémie myocardique (30 patients) [194].

Dans une revue récente sur les risques de la thérapie génique, Isner et coll. rapportent une très importante augmentation de la proportion des essais de thérapie génique qui concernent les maladies cardiovasculaires. Les effets secondaires redoutés n'ont pas été mis en évidence pour l'instant [86]. Malgré l'implication de la microcirculation dans le développement des plaques d'athérosclérose, de très nombreux essais *in vivo*, y compris chez l'homme, réfutent l'hypothèse selon laquelle le VEGF ou le FGF-4 accéléreraient ce processus. De même, les concentrations et la durée d'expression des gènes des facteurs de croissance après thérapie génique semblent insuffisants pour entraîner l'apparition d'hémangiomes ou l'émergence de tumeurs dormantes. Pour l'instant, le suivi de ces patients peut encore être considéré comme à relativement court terme (environ 3 ans), mais aucun risque majeur de réveil tumoral n'a été mis en évidence à ce jour. En ce qui concerne les rétinopathies, il semble que les concentrations sériques des composés angiogéniques soient trop faibles pour entraîner des conséquences, la proportion de substance passant la barrière hémato-oculaire étant très faible. Dans un essai prospectif de suivi de patients diabétiques, ayant plus ou moins d'antécédents de rétinopathie proliférative, aucune augmentation de la récurrence de cette maladie n'a été observée par comparaison au groupe contrôle non-diabétique.

2. Anti-angiogéniques

a) IFN γ et TNF α

La forte toxicité de ces molécules limite leur utilisation : le protocole de perfusion de membre isolé est destiné à limiter les effets secondaires graves de ces cytokines en utilisation systémique. Il a été utilisé avec succès dans de nombreuses études préliminaires chez l'animal. L'association du TNF α , de l'IFN γ et du melphalan est utilisée chez les patients atteints de mélanomes localement métastatiques [157]. On observe un taux de réponse important à ces traitements, de l'ordre de 78 % de réponses complètes, comparé à 52 % avec

le melphalan seul [112]. Chez l'animal, l'utilisation d'inhibiteurs de NOS en parallèle de ces drogues potentialise leur effet anti-tumoral [52].

b) IL-12

L'IL-12 recombinante a apporté une preuve de son efficacité dans de nombreux modèles murins [33] mais les premiers essais cliniques chez l'homme ont révélé une toxicité forte et inattendue [109]. Bien que l'activité de l'IL-12 passe par la sécrétion endogène d'IFN γ , l'administration de l'IFN γ seul, outre sa forte toxicité, ne produit pas les effets bénéfiques de l'IL-12 car cette dernière cytokine possède également la capacité de stimuler fortement l'immunité cellulaire (cellules T, NK, macrophages et cellules présentatrices d'antigènes).

Certains essais d'administration d'IL-12 recombinante ont été décevants, comme pour le cancer du rein [130]. Par contre, un essai de phase I de thérapie génique, consistant en l'injection péri-tumorale de fibroblastes transfectés par le gène de l'IL-12, montre une faible toxicité et une réponse clinique encourageante chez 4 patients sur les 9 traités dont un mélanome métastatique [93].

c) PF4

Une seule étude en phase I sur des patients atteints de cancer du colon a été publiée en 1996 avec une administration de PF4 recombinant de manière très limitée dans le temps. Les résultats étaient satisfaisants en matière de tolérance mais aucune efficacité thérapeutique n'est suggérée par cette étude [20].

C. Inhibition des interactions et des signaux intracellulaires précoces

1. Blocage du VEGF

a) Oligodeoxynucléotides anti-sens

Les oligodeoxynucléotides (ODNs) anti-sens sont une nouvelle approche technologique visant à inhiber l'expression de gènes cibles avec une haute spécificité : ils inhibent l'expression des gènes cibles en altérant l'épissage, la stabilité ou la translation des ARNm grâce à une séquence anti-sens complémentaire. La technologie permet aujourd'hui d'avoir des

ODNs stables pendant plusieurs jours. Robinson et coll. rapportent une inhibition de la vascularisation dans un modèle de vascularisation rétinienne par l'administration d'ODNs anti-VEGF de 21 nucléotides dans le vitré [153]. De même, cette approche pourrait être utilisable pour limiter la production de VEGF dans les kératinocytes dans des désordres de type psoriasis (étude in vitro) [176].

b) Anticorps monoclonaux anti-VEGF

Les anticorps recherchés sont des anticorps de haute affinité (K_D 10^{-10} à 10^{-12}), capables d'empêcher la liaison du VEGF à son récepteur ou la dimérisation de ce récepteur, et, d'un point de vue fonctionnel, qui empêchent la phosphorylation du récepteur et donc la mitogenèse induite par le VEGF. Les anticorps présélectionnés pour ces caractéristiques in vitro sont ensuite testés sur des modèles tumoraux in vivo. Des études sur des modèles animaux ont montré une stabilisation de la taille des tumeurs voire une diminution aux plus hautes doses utilisées lors de l'utilisation d'un anticorps anti-Flk-1 (DC-101) [199]. Cet anticorps ne reconnaît pas KDR, l'homologue humain de Flk-1 et n'est de ce fait pas utilisable directement en thérapeutique, toutefois son efficacité chez l'animal incite poursuivre dans cette voie.

c) Inhibiteurs des tyrosines kinases

Pour comprendre le mécanisme d'action de ces molécules, il est nécessaire de faire un bref rappel sur la structure des récepteurs à tyrosine kinase (RTKs) : il s'agit d'une large famille qui regroupe les récepteurs de nombreux facteurs de croissance et qui est caractérisée par un domaine extracellulaire spécifique d'une molécule (VEGF, FGF ou autre), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire dont l'activité enzymatique transmet le signal. Les RTKs existent à l'état monomérique à la surface cellulaire et la liaison de leur ligand spécifique induit leur dimérisation. Ce changement de conformation induit une autophosphorylation de la chaîne intracytoplasmique, qui devient attractive pour des molécules substrat qui sont à leur tour phosphorylées (PLC γ ou Shc). Ces molécules interviennent, après relais par de multiples messagers secondaires, dans la libération du calcium intracellulaire et l'activation de la cascade de la MAP kinase et finalement à des modifications de la transcription de nombreux gènes et à la prolifération de la cellule [169].

Le récepteur Flk-1 ou VEGF-R2 est un membre de cette famille, tout comme de nombreux récepteurs impliqués dans l'angiogenèse : EGF-R, PDGF-R β , FGF-R1, MET, ECK, Flt-1, Flt-

4, Tie et Tek. Toutefois, tous ne sont pas spécifiquement exprimés sur les cellules endothéliales (seuls la famille de Flk-1 et celle de Tie sont spécifiques).

L'utilisation de dominants négatifs de Flk-1 (récepteurs dont la partie intracytoplasmique est tronquée, transférés par l'intermédiaire d'un virus recombinant) a démontré le potentiel anti-angiogénique du blocage de l'activité tyrosine kinase de ce récepteur dans plusieurs modèles tumoraux murins [124].

Plusieurs approches pour bloquer ces récepteurs sont envisageables, comme l'utilisation d'anticorps bloquants, de récepteurs solubles, d'oligonucléotides anti-sens, mais également le blocage de l'activité enzymatique par des petites molécules spécifiques de la tyrosine kinase ciblée. La société SUGEN a choisi cette dernière méthode et certains composés sont en cours d'étude, comme le SU5416 (inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de Flk-1, en cours de phase II) et le SU6668 (inhibiteur de spectre plus large incluant RTKs du VEGF, du FGF et du PDGF).

2. Blocage du bFGF

a) Tecogalan sodium

Il s'agit d'un polysaccharide sulfaté qui fut isolé à partir d'une bactérie : *Arthrobacter*. Son effet anti-angiogénique passe via l'inhibition de la liaison du bFGF à ses récepteurs. La dose recommandée en phase II est de 390 mg/m² sur 24 heures toutes les 3 semaines dans des sarcomes de Kaposi. Les effets secondaires sont une élévation du temps de "thromplastin" et de la fièvre.

b) Carboxyamidotriazole

Il s'agit d'un inhibiteur synthétique de la transduction du signal via les flux calciques : il bloque les canaux calciques non-excitables. L'inhibition de l'angiogenèse est un de ses effets : il s'agit d'une diminution des phosphorylations suivant la liaison du bFGF à son récepteur, entraînant secondairement une réduction de l'expression de MMP-2. Les effets secondaires sont des nausées, beaucoup de fatigue, voire de l'anorexie [22]. Il inhibe de manière réversible l'invasion, la croissance et l'angiogenèse tumorale. La stabilisation de 49% des patients ayant des maladies évolutives (cancers du rein, pancréas, ovaire, mélanome et poumon non à petites cellules), traités sur 7 mois, a permis de poursuivre l'évaluation thérapeutique en phase II à la dose de 100 à 150 mg/m²/jour selon la formulation [100].

3. Thalidomide

Précisément il s'agit de l' α -N-[phthalimido]glutarimide. Après absorption orale, la thalidomide est majoritairement et non-enzymatiquement dégradée en une vingtaine de métabolites. La métabolisation hépatique par le cytochrome P450 est faible, toutefois c'est elle qui semble aboutir au composé anti-angiogénique [60]. Son mécanisme d'action est mal connu. Il s'agirait de la dégradation de l'ARNm et donc de la production de $\text{TNF}\alpha$ [7]. Sands et Podolsky rappellent que la thalidomide modifie d'autres paramètres tels que le profil d'expression de l'IL-12 et celui des intégrines, et qu'elle diminue la migration des leucocytes via une inhibition de la PKC [159].

D'Amato et coll. suggèrent, dans un modèle de vascularisation cornéenne, que les propriétés anti-angiogéniques de la thalidomide soient liées au blocage de l'activité du bFGF. Ce sont ces propriétés qui sont responsables des effets tératogènes graves qui avaient été à l'origine du retrait du marché de la thalidomide au tout début des années 1960 [49]. De nombreux modèles in vitro et in vivo convergent dans ce sens. On ne peut toutefois pas négliger l'action immunomodulatrice de la thalidomide (inhibition du $\text{TNF}\alpha$) qui pourrait intervenir dans les rémissions observées dans des cas de myélomes récidivants [150]. De même, c'est sa faculté d'inhibition du $\text{TNF}\alpha$, et non ses propriétés anti-angiogéniques, qui est probablement le mécanisme impliqué dans l'activité bénéfique de la thalidomide sur la maladie de Crohn [190].

Les effets secondaires les plus courants sont fatigue, constipation, hypotension orthostatique et éruptions cutanées. Toutefois quelques cas de neuropathie périphérique comportant des paresthésies douloureuses ou associées à une perte de sensibilité ont été rapportés, et peuvent parfois devenir permanents [150].

4. Blocage des intégrines

a) Vitaxine

Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'anticorps murin LM609 est capable d'induire une régression tumorale et d'améliorer des arthrites expérimentales : son mécanisme d'action semble passer par une apoptose des cellules endothéliales. Son homologue humanisé a été testé pour évaluer sa sécurité chez des patients. La tolérance est

excellente : aucun arrêt prématuré du traitement, aucune toxicité cardiaque, hépatique ou rénale ni hématologique. Ceci est très favorable puisque l'administration des molécules anti-angiogéniques doit vraisemblablement se faire sur une longue période. Cet anticorps n'a pas non plus déclenché de réponse immunitaire. L'étude n'a pas montré de réponse clinique véritable mais a lieu sur des tumeurs avancées, dans lesquelles les vaisseaux sont déjà établis et moins susceptibles parce qu'exprimant moins les intégrines [76,148]. La faible toxicité de cette molécule devrait lui permettre d'être testée à plus grande échelle.

b) Triflavine

C'est un peptide contenant la séquence RGD spécifique des intégrines $\alpha v \beta$ et obtenu à partir du venin d'un serpent *trimeresurus flavoviridis*. Il est beaucoup plus efficace (30 fois plus) que la Vitaxine in vitro pour inhiber la migration des cellules endothéliales induite par la fibronectine et la vitronectine, et pour bloquer l'angiogenèse induite par le $TNF\alpha$ [171]. Aucune étude n'a toutefois confirmé ces résultats depuis.

D. Inhibition des signaux intracellulaires tardifs

1. Rétinoïdes

Il s'agit des dérivés naturels ou synthétiques de la vitamine A. Ils exercent plusieurs fonctions anti-tumorales : induction de la différenciation cellulaire, inhibition de la sécrétion d'u-PA ainsi que suppression de la synthèse de MMP. Ils sont utilisés dans le traitement de certains cancers épithéliaux et de la leucémie à promyélocytes. Ils entraînent de nombreux effets secondaires par un mécanisme mal connu. Il existe 2 types de récepteurs nucléaires : les RAR (retinoic acid receptors) et les RXR (retinoid X receptors). Ces récepteurs sont impliqués dans l'inhibition du facteur de transcription AP-1, lui-même intervenant dans l'expression de molécules pro-angiogéniques comme les collagénases et les stromélysines. Les recherches se poursuivent pour isoler des rétinoïdes ayant spécifiquement cette activité anti-AP1 de manière à diminuer les effets secondaires [111].

2. Bryostatin-1

Il s'agit d'un composé de type lactone macrocyclique isolé à partir d'une algue marine, la bryosoan. Il interagit avec la cascade d'activation de la PKC, elle-même impliquée dans

l'expression des MMP via son interaction avec les séquences promotrices d'AP-1. La Bryostatine –1 est capable d'inhiber le processus métastatique et angiogénique dans plusieurs modèles tumoraux murins [83]. Toutefois, les nombreux rôles de la PKC dans les mécanismes de mort et de survie cellulaire, qui touchent les cellules tumorales aussi bien que les endothéliales, rendent les résultats très variables in vivo et leur interprétation très difficile [80].

3. Inhibiteurs des cyclo-oxygénases (COX)

Les enzymes de la famille des COX catalysent la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandine PGE₂. Les inhibiteurs des COX sont les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS). Il a été constaté que les utilisateurs fréquents d'AINS comme les patients arthritiques ont une incidence diminuée de cancers digestifs, en comparaison avec la population générale. En effet, COX-2 est fréquemment surexprimée dans les adénocarcinomes de colon et de cancers gastriques comparé à l'expression dans les tissus sains adjacents des tumeurs (80%). Il a donc été suggéré que cette isoforme puisse être impliquée dans le développement de certains néoplasmes. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de cette enzyme (NS-398) a montré sa capacité à induire l'apoptose des cellules tumorales in vivo mais pas in vitro, ce qui suggère un effet indirect. L'inhibition de COX-2, dans les tumeurs qui la surexpriment à l'état basal, supprime l'expression de bFGF et VEGF par la tumeur in vivo [162] : PGE₂ interviendrait donc au niveau de la régulation de l'expression des gènes des médiateurs pro-angiogéniques.

Les tumeurs n'exprimant pas COX-2 mais COX-1 sont également sensibles à l'action d'un inhibiteur mais par un mécanisme indépendant de bFGF et VEGF [162].

D'autre part, Masferrer a montré que l'angiogenèse induite artificiellement par des implants de bFGF pouvait être inhibée grâce à l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de COX-2 (SC-560) et pas de par celui inhibant COX-1 (SC-236) [119] : ceci suggère que PGE₂ interviendrait en aval de la cascade proangiogénique de bFGF.

4. Combretastatine A4

C'est un membre de la famille de la vinblastine et de la vincristine, agent chimiothérapeutiques se liant à la tubuline. Contrairement aux autres membres de la famille, la combretastatine A4 exerce un effet sur les cellules endothéliales en prolifération uniquement et surtout à une dose non-toxique. Cette action se traduit par une interruption du

flux sanguin suite à une unique administration [18]. En effet, la combretastatine A4 modifie la forme des cellules endothéliales en interagissant avec le cytosquelette : ceci altère le flux sanguin, expose la membrane basale et induit des hémorragies associées à une coagulation intra-vasculaire. Plusieurs études sur des modèles de tumeurs humaines métastatiques sont actuellement en cours.

E. Inhibition des molécules de la matrice extra-cellulaire

1. Inhibiteurs des protéases

Les métalloprotéinases (collagénases, gélatinases, métalloélastase, stromélysine, matrilysine) sont impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Leurs inhibiteurs ont montré une efficacité en diminuant le potentiel invasif de cellules endothéliales transformées dans un matrigel [185] et le recrutement de cellules endothéliales normales dans la xénogreffe tumorale chez la souris nude [173].

Les inhibiteurs des MMP vont de simples agents chélateurs comme l'EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) à des peptides synthétiques dessinés en fonction de la structure connue du site actif des MMP, et adaptés pour une meilleure spécificité, sans oublier les molécules naturelles (TIMPs). La première génération de composés comportait le Batimastat (BB94 de British Biotech) qui a été testé in vivo à la dose de 30 mg/kg. Toutefois sa très faible solubilité le limite aux utilisations par voie intra-péritonéale ce qui n'est pas compatible avec une utilisation à long terme en traitement d'entretien. Il inhibe la pénétration des cellules endothéliales à travers du matrigel, la croissance dans un modèle de tumeur vasculaire murin et le phénomène métastatique dans un modèle de tumeur mammaire chez le rat avec résection chirurgicale de la tumeur primaire [185]. Ce type d'inhibiteur peut également altérer la motricité des cellules tumorales [193]. Talbot et Brown rapportent que le Batimastat a été utilisé avec succès chez des patientes atteintes de cancer ovarien associé à une ascite, toutefois la toxicité intestinale aiguë présente lors d'administration intra-péritonéale a bloqué le développement de ce médicament. Son administration intra-pleurale chez des patients présentant une effusion pleurale ne met pas en évidence une telle toxicité et des évaluations à plus large échelle sont en cours [183].

La deuxième génération d'inhibiteurs de protéases comportait le Marimastat (BB2516), le Ro 31-90 (de Roche) et le CGS 27023A (de Ciba-Geigy). L'efficacité du Marimastat n'a pu être démontrée dans les carcinomes pancréatiques par rapport à une chimiothérapie classique, mais il en est actuellement en cours d'évaluation de phase II pour le cancer de l'ovaire et phase III pour le cancer du poumon à petites cellules ou non, le glioblastome, le cancer du sein métastatique et celui du colon (NCI) [200]. Les effets secondaires principaux des inhibiteurs de MMP sont une inflammation et des douleurs musculo-squelettiques de type tendinites [151].

L'AG3340, ou Prinomastat, est un inhibiteur spécifique des gélatinases (MMP-2 et -8) de la MT1-MMP et de la collagénase-3. L'AG3340 induit un retard important de la croissance tumorale dans certains modèles de xénogreffe chez la souris (glioblastome, cancer du sein) de façon non ubiquitaire. Le mécanisme d'action passe par une inhibition de l'angiogenèse dans tous les modèles, parfois associé à des effets pro-apoptotiques et pro-nécrotiques. L'utilisation de l'AG3340 en combinaison avec le taxol ou le carboplatin a donné des résultats très prometteurs comparés à la chimiothérapie seule. L'AG3340 est bien toléré par voie intrapéritonéale ou orale, et sa spécificité limite les effets secondaires (pas d'action sur MMP-1) [168]. Il est en cours d'évaluation en phase III pour le cancer de poumon non à petites cellules et le cancer de la prostate, ainsi que dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

D'autres molécules du même type sont également au stade des essais cliniques, comme le Néovastat (AE941), le BAY 12-9566, le Trocade™ (Ro 32-3555) pour la polyarthrite rhumatoïde et le Ro 113-830 pour l'ostéoarthrite [200].

L'uPA est essentiel à l'activation des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice, des inhibiteurs ont donc été testés avec succès chez l'animal. Toutefois, l'irréversibilité de ces agents ou leur manque de spécificité ne permet pas à l'heure actuelle de les tester chez l'homme [120].

2. TNP-470

La fumagilline est un produit d'origine fongique (*Aspergillus Fumigatus fresenius*) qui, malgré des caractéristiques intéressantes in vitro, possède une forte toxicité in vivo. Plusieurs analogues structuraux semi-synthétiques ont été produits, dont l'AGM-1470 ou TNP-470 qui possède une activité angiostatique notable (50 fois plus puissante que la fumagilline) et une

toxicité moindre [13]. L'effet anti-angiogénique se produit à faible dose alors qu'une inhibition de la prolifération des cellules tumorales elles-mêmes a lieu à forte dose (3 log de différence). La demi-vie plasmatique du produit est courte car certains groupements responsables de sa spécificité sont très labiles.

Le TNP-470 se fixe de manière covalente à une métalloprotéinase : la méthionine aminopeptidase de type 2 (MetAp2) et ce de manière hautement spécifique (nombreuses interactions moléculaires secondaires avec liaisons hydrophobes et hydrogène). Les protéines cibles de cette enzyme sont mal connues. Son activation aboutit, sans doute de manière indirecte, à la suppression de l'expression des ARNm codant pour certaines cyclines impliquées dans le déroulement du cycle cellulaire des cellules endothéliales (cdc2 ou cycline A) [1]. Zhang et coll. ont récemment démontré l'implication de p53 et surtout de p21 dans le mécanisme d'action du TNP-470, aboutissant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 [205]. Les molécules cibles du TNP-470 ne sont donc pas spécifiques des cellules endothéliales, encore moins pathologiques : son action n'est pas limitée à l'angiogenèse pathologique, il interfère également avec les fonctions reproductrices chez la femelle [98].

L'inhibition de la croissance des tumeurs primaires ou secondaires par le TNP-470 est importante dans de nombreux modèles animaux (plus de 80 % d'inhibition de croissance, et une survie augmentée de 56 à 100%) [13]. Des essais d'associations avec des drogues chimiothérapeutiques (adriamycine, cisplatine) montrent un effet additif pour un mélanome, un cancer prostatique et un carcinome pulmonaire. L'activité du TNP-470 est en revanche minime sur les tumeurs de la sphère ORL [71].

Le TNP-470 a également été testé dans un modèle d'arthrite induite par le collagène ou par l'adjuvant de Freund chez le rat, modèles se rapprochent de la polyarthrite rhumatoïde : la sévérité et l'incidence des arthrites étaient significativement diminuées, et la thérapie combinée avec la cyclosporine A ou le paclitaxel (drogues usuellement utilisées dans cette maladie) montre un effet additif [40].

Le TNP-470 peut avoir un effet immunosuppresseur paradoxal : il augmente l'incidence et la croissance de métastases lymphatiques dans un modèle de sarcome chez le rat entraînant une hypoplasie du tissu lymphoïde [81]. D'autres auteurs ont montré qu'au contraire il favoriserait l'activation des cellules T en augmentant la production d'IL-2 [115].

Une trentaine de patients atteints de cancers avancés prétraités par chimiothérapie ont été inclus dans un essai de phase I. La dose maximale tolérée est de 235 mg/m² pour un traitement hebdomadaire et 60 mg/m² pour un traitement journalier. Quelques cas de stabilisation de cancer du col utérin métastatique, d'un mélanome métastatique et d'un histiocytome ont été rapportés, la durée des stabilisations étant corrélée à la dose reçue [13]. La dose retenue pour les essais de phase II est de 60 mg/m² trois fois par semaine en continu. Des essais encourageants de phase I sont également en cours dans des sarcomes de Kaposi liés au sida (18% de réponses partielles) [55].

Il existe une toxicité neurologique cérébelleuse du TNP-470 sous forme de vertiges, ataxie, photophobie et troubles cognitifs et psychiques. Ces signes disparaissent après arrêt du traitement. D'autres effets secondaires sans gravité tels que nausées, thrombopénies, fatigue, ont été rapportés. C'est le métabolite inactif qui est responsable de ces effets.

Conclusion

L'angiogenèse apparaît aujourd'hui comme un mécanisme fondamental de l'homéostasie de l'organisme. Encore ignorée il y a à peine 30 ans, son étude est actuellement une discipline au centre des investigations de milliers de chercheurs de par le monde. Témoignant de ce travail, les méthodes de quantification de l'angiogenèse se perfectionnent de plus en plus, avec actuellement des technologies totalement non-invasives comme l'échographie-doppler ou l'imagerie par résonance magnétique, qui sont aisément utilisables pour le suivi des patients. Les progrès dans la compréhension des mécanismes en jeu et de la thérapeutique sont proportionnels à l'enthousiasme du monde scientifique et médical.

Judah Folkman a été le premier à insister sur le rôle de l'angiogenèse dans l'émergence des tumeurs. L'implication potentielle de ces dérèglements dans d'autres anomalies de l'organisme s'est ensuite rapidement fait jour. Comme nous l'avons souligné dans ce travail, la régulation de l'angiogenèse résulte d'un équilibre fragile et complexe entre des médiateurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques, organisés en réseau et soumis à de multiples boucles de rétrocontrôle. Toute perturbation de cette balance peut aboutir à une situation pathologique, les exemples les plus marquants étant représentés par les tumeurs, les rétinopathies, les défauts de cicatrisation dans le diabète et autres ulcères.

Pourtant, la connaissance augmente assez inégalement dans le domaine clinique : certaines maladies, dans lesquelles le rôle de l'angiogenèse est pourtant incontestable, ne semblent pas bénéficier des acquis de la recherche. Il s'agit souvent de situations où l'angiogenèse anormale ne représente qu'une partie du processus pathologique (inflammations chroniques, anomalies de la cicatrisation, dégénérescence maculaire liée à l'âge), ce qui complique la mise en place des évaluations thérapeutiques. Le manque de modèles d'études animaux reproduisant la maladie humaine et la possible survenue d'effets secondaires graves sont aussi des freins à l'expérimentation.

D'autres domaines progressent à grande vitesse, comme ceux de la cancérologie et de la pathologie cardio-vasculaire. En effet, malgré les obstacles méthodologiques rencontrés dans le domaine du cancer (drogues cytostatiques comparées à des drogues de référence cytotoxiques), l'évaluation de nombreuses molécules est en cours, et la découverte de nouvelles candidates ne cesse de se poursuivre. Dans les maladies musculaires ischémiques, l'application de protocoles de thérapie génique est en plein essor et les résultats sont extrêmement encourageants. Les difficultés liées à la spécificité de ces techniques ont, apparemment, été surmontées même si l'on doit encore rester prudent, étant donné le faible recul de ces études. Ces protocoles ne pourront que bénéficier des progrès à venir dans l'élaboration de vecteurs de thérapie génique plus maniables et plus sûrs.

L'angiogenèse et ses mécanismes régulateurs sont encore loin d'être maîtrisés, mais les applications thérapeutiques des connaissances déjà acquises permettent d'être optimiste. Il faut juste espérer que l'enthousiasme manifesté pour cette nouvelle discipline ne va pas décroître et que les obstacles, résultants de la complexité de ce système, seront surmontés.

Bibliographie

1. Abe J., Zhou W., Takuwa N., Taguchi J., Kurokawa K., Kumada M., et al.: A fumagillin derivative angiogenesis inhibitor, AGM-1470, inhibits activation of cyclin-dependent kinases and phosphorylation of retinoblastoma gene product but not protein tyrosyl phosphorylation or protooncogene expression in vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1994 **54**:3407-3412.
2. Adamis A.P., Aiello L.P., D'Amato R.A.: Angiogenesis and ophthalmic disease. *Angiogenesis* 1999 **3**:9-14
3. Albini A., Soldi R., Giunciuglio D., Giraudo E., Benelli R., Primo L., et al.: The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 1996 **2**:1371-1375.
4. Algire G.: An adaptation of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst USA* 1943 **4**:1-11
5. Arap W., Pasqualini R., Ruoslahti E.: Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998 **279**:377-380.
6. Arenberg D.A., Kunkel S.L., Polverini P.J., Glass M., Burdick M.D., Strieter R.M.: Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. *J Clin Invest* 1996 **97**:2792-2802.
7. Argiles J.M., Carbo N., Lopez-Soriano F.J.: Was tumour necrosis factor-alpha responsible for the fetal malformations associated with thalidomide in the early 1960s? *Med Hypotheses* 1998 **50**:313-318.
8. Arihiro S., Ohtani H., Hiwatashi N., Torii A., Sorsa T., Nagura H.: Vascular smooth muscle cells and pericytes express MMP-1, MMP-9, TIMP-1 and type I procollagen in inflammatory bowel disease. *Histopathology* 2001 Jul **39**:50-59.
9. Arras M., Ito W.D., 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.
10. Auerbach R., Akhtar N., Lewis R.L., Shinnars B.L.: Angiogenesis assays: problems and pitfalls. *Cancer Metastasis Rev* 2000 **19**:167-172.
11. Badet J.: Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol Biol (Paris)* 1999 **47**:345-351.
12. Baffour R., Berman J., Garb J.L., Rhee S.W., Kaufman J., Friedmann P.: Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg* 1992 **16**:181-191.
13. Bailly C., Lansiaux A.: An angiogenesis inhibitor: TNP-470. *Bull Cancer* 2000 **87**:449-454.
14. Banai S., Jaklitsch M.T., Shou M., Lazarous D.F., Scheinowitz M., Biro S., et al.: Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 1994 **89**:2183-2189.

15. Bashkin P., Doctrow S., Klagsbrun M., Svahn C.M., Folkman J., Vlodavsky I.: Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry* 1989 **28**:1737-1743.
16. Bategay E.J.: Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med* 1995 **73**:333-346.
17. Baumgartner I., Pieczek A., Manor O., Blair R., Kearney M., Walsh K., et al.: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998 **97**:1114-1123.
18. Beauregard D.A., Thelwall P.E., Chaplin D.J., Hill S.A., Adams G.E., Brindle K.M.: Magnetic resonance imaging and spectroscopy of combretastatin A4 prodrug-induced disruption of tumour perfusion and energetic status. *Br J Cancer* 1998 **77**:1761-1767.
19. Bellamy W.T., Richter L., Frutiger Y., Grogan T.M.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999 **59**:728-733.
20. Belman N., Bonnem E.M., Harvey H.A., Lipton A.: Phase I trial of recombinant platelet factor 4 (rPF4) in patients with advanced colorectal carcinoma. *Invest New Drugs* 1996 **14**:387-389.
21. Belperio J.A., Keane M.P., Arenberg D.A., Addison C.L., Ehlert J.E., Burdick M.D., et al.: CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 2000 **68**:1-8.
22. Berlin J., Tutsch K.D., Hutson P., Cleary J., Rago R.P., Arzoomanian R.Z., et al.: Phase I clinical and pharmacokinetic study of oral carboxyamidotriazole, a signal transduction inhibitor. *J Clin Oncol* 1997 **15**:781-789.
23. Bicknell R., Vallee B.L.: Angiogenin activates endothelial cell phospholipase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 **85**:5961-5965.
24. Bikfalvi A., Javerzat S., Perollet C., Savona C.: [Angiogenesis and cancer]. *Bull Cancer* 1997 **84**:885-890.
25. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D.B.: Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 1997 **18**:26-45.
26. Blavier L., Henriot P., Imren S., Declerck Y.A.: Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1999 **878**:108-119.
27. Bornstein P., Kyriakides T.R., Yang Z., Armstrong L.C., Birk D.E.: Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000 **5**:61-66.
28. Broadley K.N., Aquino A.M., Woodward S.C., Buckley-Sturrock A., Sato Y., Rifkin D.B., et al.: Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest* 1989 **61**:571-575.
29. Brogi E., Winkles J.A., Underwood R., Clinton S.K., Alberts G.F., Libby P.: Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *J Clin Invest* 1993 **92**:2408-2418.
30. Brooks P.C.: Role of integrins in angiogenesis. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2423-2429.
31. Brooks P.C., Silletti S., von Schalscha T.L., Friedlander M., Cheresch D.A.: Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 1998 **92**:391-400.

32. Brown L.F., Yeo K.T., Berse B., Yeo T.K., Senger D.R., Dvorak H.F., et al.: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992 **176**:1375-1379.
33. Brunda M.J., Luistro L., Rumennik L., Wright R.B., Dvorozniak M., Aglione A., et al.: Antitumor activity of interleukin 12 in preclinical models. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996 **38 Suppl**:S16-21.
34. Burger M., Burger J.A., Hoch R.C., Oades Z., Takamori H., Schraufstatter I.U.: Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor. *J Immunol* 1999 **163**:2017-2022.
35. Bussolino F., Camussi G., Aglietta M., Braquet P., Bosia A., Pescarmona G., et al.: Human endothelial cells are target for platelet-activating factor. I. Platelet-activating factor induces changes in cytoskeleton structures. *J Immunol* 1987 **139**:2439-2446.
36. Camussi G., Montrucchio G., Lupia E., De Martino A., Perona L., Arese M., et al.: Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism. *J Immunol* 1995 **154**:6492-6501.
37. Camussi G., Montrucchio G., Lupia E., Soldi R., Comoglio P.M., Bussolino F.: Angiogenesis induced in vivo by hepatocyte growth factor is mediated by platelet-activating factor synthesis from macrophages. *J Immunol* 1997 **158**:1302-1309.
38. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., et al.: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996 **380**:435-439.
39. Carmeliet P., Moons L., Luttun A., Vincenti V., Compernelle V., De Mol M., et al.: Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 2001 **7**:575-583.
40. Castronovo V., Belotti D.: TNP-470 (AGM-1470): mechanisms of action and early clinical development. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2520-2527.
41. Celletti F.L., Waugh J.M., Amabile P.G., Brendolan A., Hilfiker P.R., Dake M.D.: Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001 Apr **7**:425-429.
42. Chaplin D.J., Dougherty G.J.: Tumour vasculature as a target for cancer therapy. *Br J Cancer* 1999 **80 Suppl 1**:57-64.
43. Chung Y.S., Maeda K., Sowa M.: Prognostic value of angiogenesis in gastrointestinal tumours. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2501-2505.
44. Clezardin P., Bruno-Bossio G., Fontana A., Serre C.M., Magnetto S., Frappart L.: Thrombospondines, angiogenèse tumorale et cancer du sein. *Pathol Biol (Paris)* 1999 **47**:368-374.
45. Connolly D.T., Heuvelman D.M., Nelson R., Olander J.V., Eppley B.L., Delfino J.J., et al.: Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989 **84**:1470-1478.
46. Coughlin C.M., Salhany K.E., Wysocka M., Aruga E., Kurzawa H., Chang A.E., et al.: Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest* 1998 **101**:1441-1452.

47. Cozzolino F., Torcia M., Lucibello M., Morbidelli L., Ziche M., Platt J., et al.: Interferon-alpha and interleukin 2 synergistically enhance basic fibroblast growth factor synthesis and induce release, promoting endothelial cell growth. *J Clin Invest* 1993 **91**:2504-2512.
48. Dachs G.U., Chaplin D.J.: Microenvironmental control of gene expression: implications for tumor angiogenesis, progression, and metastasis. *Semin Radiat Oncol* 1998 **8**:208-216.
49. D'Amato R.J., Loughnan M.S., Flynn E., Folkman J.: Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 **91**:4082-4085.
50. Dameron K.M., Volpert O.V., Tainsky M.A., Bouck N.: Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 1994 **265**:1582-1584.
51. Danis R.P., Ciulla T.A., Criswell M., Pratt L.: Anti-angiogenic therapy of proliferative diabetic retinopathy. *Expert Opin Pharmacother* 2001 Mar **2**:395-407.
52. de Wilt J.H., Manusama E.R., van Etten B., van Tiel S.T., Jorna A.S., Seynhaeve A.L., et al.: Nitric oxide synthase inhibition results in synergistic anti-tumour activity with melphalan and tumour necrosis factor alpha-based isolated limb perfusions. *Br J Cancer* 2000 Nov **83**:1176-1182.
53. Defilippi P., Truffa G., Stefanuto G., Altruda F., Silengo L., Tarone G.: Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma modulate the expression of the vitronectin receptor (integrin beta 3) in human endothelial cells. *J Biol Chem* 1991 **266**:7638-7645.
54. Delorme S., Knopp M.V.: Non-invasive vascular imaging: assessing tumour vascularity. *Eur Radiol* 1998 **8**:517-527.
55. Dezube B.J., Von Roenn J.H., Holden-Wiltse J., Cheung T.W., Remick S.C., Cooley T.P., et al.: Fumagillin analog in the treatment of Kaposi's sarcoma: a phase I AIDS Clinical Trial Group study. AIDS Clinical Trial Group No. 215 Team. *J Clin Oncol* 1998 **16**:1444-1449.
56. Dhanabal M., Ramchandran R., Waterman M.J., Lu H., Knebelmann B., Segal M., et al.: Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999 **274**:11721-11726.
57. Dias S., Boyd R., Balkwill F.: IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model. *Int J Cancer* 1998 **78**:361-365.
58. Dong Z., Kumar R., Yang X., Fidler I.J.: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell* 1997 **88**:801-810.
59. Duda D.G., Sunamura M., Lozonschi L., Kodama T., Egawa S., Matsumoto G., et al.: Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000 Feb 15 **60**:1111-1116.
60. Eatock M.M., Schatzlein A., Kaye S.B.: Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2000 **26**:191-204.
61. Fajardo L.F., Kwan H.H., Kowalski J., Prionas S.D., Allison A.C.: Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *Am J Pathol* 1992 **140**:539-544.
62. Florkiewicz R.Z., Majack R.A., Buechler R.D., Florkiewicz E.: Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J Cell Physiol* 1995 **162**:388-399.
63. Folkman J.: Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995 **333**:1757-1763.

64. Folkman J., Szabo S., Stovroff M., McNeil P., Li W., Shing Y.: Duodenal ulcer. Discovery of a new mechanism and development of angiogenic therapy that accelerates healing. *Ann Surg* 1991 **214**:414-425; discussion 426-417.
65. Frelin C., Ladoux A., G D.a.: Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)* 2000 **61**:70-74.
66. Friedlander M., Brooks P.C., Shaffer R.W., Kincaid C.M., Varner J.A., Cheres D.A.: Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 1995 **270**:1500-1502.
67. Gaudry M., Bregerie O., Andrieu V., El Benna J., Pocidalo M.A., Hakim J.: Intracellular pool of vascular endothelial growth factor in human neutrophils. *Blood* 1997 **90**:4153-4161.
68. Gentilini G., Kirschbaum N.E., Augustine J.A., Aster R.H., Visentin G.P.: Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cip1/WAF1). *Blood* 1999 **93**:25-33.
69. Gerber H.P., Hillan K.J., Ryan A.M., Kowalski J., Keller G.A., Rangell L., et al.: VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999 **126**:1149-1159.
70. Gerber H.P., McMurtrey A., Kowalski J., Yan M., Keyt B.A., Dixit V., et al.: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998 **273**:30336-30343.
71. Gleich L.L., Zimmerman N., Wang Y.O., Gluckman J.L.: Angiogenic inhibition for the treatment of head and neck cancer. *Anticancer Res* 1998 **18**:2607-2609.
72. Gole G.A., Browning J., Elts S.M.: The mouse model of oxygen-induced retinopathy: a suitable animal model for angiogenesis research. *Doc Ophtalmol* 1990 **74**:163-169.
73. Griffiths L., Stratford I.J.: Platelet-derived endothelial cell growth factor thymidine phosphorylase in tumour growth and response to therapy. *Br J Cancer* 1997 **76**:689-693.
74. Guo N., Kruttsch H.C., Inman J.K., Roberts D.D.: Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 1997 **57**:1735-1742.
75. Gupta S.K., Hassel T., Singh J.P.: A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 **92**:7799-7803.
76. Gutheil J.C., Campbell T.N., Pierce P.R., Watkins J.D., Huse W.D., Bodkin D.J., et al.: Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin Cancer Res* 2000 **6**:3056-3061.
77. Hamawy A.H., Lee L.Y., Crystal R.G., Rosengart T.K.: Cardiac angiogenesis and gene therapy: a strategy for myocardial revascularization. *Curr Opin Cardiol* 1999 **14**:515-522.
78. Hansell P., Maione T.E., Borgstrom P.: Selective binding of platelet factor 4 to regions of active angiogenesis in vivo. *Am J Physiol* 1995 **269**:H829-836.
79. Heymach J.V.: Angiogenesis and antiangiogenic approaches to sarcomas. *Curr Opin Oncol* 2001 **13**:261-269.

80. Hofmann J.: Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2001 **142**:1-96.
81. Hori K., Li H.C., Saito S., Sato Y.: Increased growth and incidence of lymph node metastases due to the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Br J Cancer* 1997 **75**:1730-1734.
82. Hornig C., Weich H.: Soluble VEGF receptors. *Angiogenesis* 1999 **3**:33-39
83. Hornung R.L., Pearson J.W., Beckwith M., Longo D.L.: Preclinical evaluation of bryostatins as anticancer agents against several murine tumor cell lines: in vitro versus in vivo activity. *Cancer Res* 1992 **52**:101-107.
84. Hoshino M., Nakamura Y., Hamid Q.A.: Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2001 **107**:1034-1038.
85. Ikeda U., Shimpo M., Ohki R., Inaba H., Takahashi M., Yamamoto K., et al.: Fluvastatin inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells. *Hypertension* 2000 Sep **36**:325-329.
86. Isner J.M., Vale P.R., Symes J.F., Losordo D.W.: Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res* 2001 Aug **31**:389-400.
87. Jenq W., Wu S.J., Kefalides N.A.: Expression of the alpha 2-subunit of laminin correlates with increased cell adhesion and metastatic propensity. *Differentiation* 1994 **58**:29-36.
88. Jimi S., Ito K., Kohno K., Ono M., Kuwano M., Itagaki Y., et al.: Modulation by bovine angiogenin of tubular morphogenesis and expression of plasminogen activator in bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 **211**:476-483.
89. Jones N., Dumont D.J.: Tek/Tie2 signaling: new and old partners. *Cancer Metastasis Rev* 2000 **19**:13-17.
90. Jouan V., Canron X., Alemany M., Caen J.P., Quentin G., Plouet J., et al.: Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* 1999 **94**:984-993.
91. Kampfer H., Pfeilschifter J., Frank S.: Expressional regulation of angiopoietin-1 and -2 and the tie-1 and -2 receptor tyrosine kinases during cutaneous wound healing: a comparative study of normal and impaired repair. *Lab Invest* 2001 **81**:361-373.
92. Kanazawa S., Tsunoda T., Onuma E., Majima T., Kagiya M., Kikuchi K.: VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001 **96**:822-828.
93. Kang W.K., Park C., Yoon H.L., Kim W.S., Yoon S.S., Lee M.H., et al.: Interleukin 12 gene therapy of cancer by peritumoral injection of transduced autologous fibroblasts: outcome of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2001 Apr **12**:671-684.
94. Keane M.P., Arenberg D.A., Lynch J.P., 3rd, Whyte R.I., Iannettoni M.D., Burdick M.D., et al.: The CXC chemokines, IL-8 and IP-10, regulate angiogenic activity in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Immunol* 1997 **159**:1437-1443.
95. Keane M.P., Belperio J.A., Arenberg D.A., Burdick M.D., Xu Z.J., Xue Y.Y., et al.: IFN-gamma-inducible protein-10 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis via inhibition of angiogenesis. *J Immunol* 1999 **163**:5686-5692.

96. Kesari A.L., Chellam V.G., Mathew B.S., Nair M.K., Pillai M.R.: Transforming Growth Factor Beta Related to Extent of Tumor Angiogenesis but Not Apoptosis or Proliferation in Breast Carcinoma. *Breast Cancer* 1999 **6**:29-36.

97. King G.L., Brownlee M.: The cellular and molecular mechanisms of diabetic complications. *Endocr Rev* 1999 **20**:364-394.

effects on AP-1 activity and retinoic acid-induced apoptosis in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1999 **274**:15360-15366.

112. Lienard D., Eggermont A.M., Koops H.S., Kroon B., Towse G., Hiemstra S., et al.: Isolated limb perfusion with tumour necrosis factor-alpha and melphalan with or without interferon-gamma for the treatment of in-transit melanoma metastases: a multicentre randomized phase II study. *Melanoma Res* 1999 **9**:491-502.

113. Lingen M.W.: Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med* 2001 **125**:67-71.

114. Liss C., Fekete M.J., Hasina R., Lam C.D., Lingen M.W.: Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer* 2001 Sep15 **93**:781-785.

115. Locigno R., Antoine N., Bours V., Daukandt M., Heinen E., Castronovo V.: TNP-470, a potent angiogenesis inhibitor, amplifies human T lymphocyte activation through an induction of nuclear factor-kappaB, nuclear factor-AT, and activation protein-1 transcription factors. *Lab Invest* 2000 **80**:13-21.

116. Loetscher M., Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., et al.: Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med* 1996 **184**:963-969.

117. Losordo D.W., Vale P.R., Symes J.F., Dunnington C.H., Esakof D.D., Maysky M., et al.: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998 **98**:2800-2804.

118. Maciag T., Zhan X., Garfinkel S., Friedman S., Prudovsky I., Jackson A., et al.: Novel mechanisms of fibroblast growth factor 1 function. *Recent Prog Horm Res* 1994 **49**:105-123.

119. Masferrer J.L., Koki A., Seibert K.: COX-2 inhibitors. A new class of antiangiogenic agents. *Ann N Y Acad Sci* 1999 **889**:84-86.

120. Mazar A., Henkin J., Goldfarb R.: The urokinase plasminogen activator system in cancer : implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis* 1999 **3**:15-32

121. Mellin T.N., Cashen D.E., Ronan J.J., Murphy B.S., DiSalvo J., Thomas K.A.: Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice. *J Invest Dermatol* 1995 **104**:850-855.

122. Meyer M., Clauss M., Lepple-Wienhues A., Waltenberger J., Augustin H.G., Ziche M., et al.: A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 1999 **18**:363-374.

123. Miao H.Q., Klagsbrun M.: Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 2000 **19**:29-37.

124. Millauer B., Longhi M.P., Plate K.H., Shawver L.K., Risau W., Ullrich A., et al.: Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res* 1996 **56**:1615-1620.

125. Minicucci G., Lepore D., Molle F.: Abnormal retinal vascularisation in preterm children. *Lancet* 1999 **353**:1099-1100.

126. Miyadera K., Sumizawa T., Haraguchi M., Yoshida H., Konstanty W., Yamada Y., et al.: Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 1995 **55**:1687-1690.

127. Miyamoto S., Katz B.Z., Lafrenie R.M., Yamada K.M.: Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1998 **857**:119-129.
128. Mofidi R., Crotty T.B., McCarthy P., Sheehan S.J., Mehigan D., Keaveny T.V.: Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 2001 Jul **88**:945-950.
129. Montrucchio G., Lupia E., de Martino A., Battaglia E., Arese M., Tizzani A., et al.: Nitric oxide mediates angiogenesis induced in vivo by platelet-activating factor and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* 1997 **151**:557-563.
130. Motzer R.J., Rakhit A., Thompson J.A., Nemunaitis J., Murphy B.A., Ellerhorst J., et al.: Randomized multicenter phase II trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 versus interferon-alpha 2a for patients with advanced renal cell carcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 2001 Apr **21**:257-263.
131. Moulton K.S., Heller E., Konerding M.A., Flynn E., Palinski W., Folkman J.: Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999 **99**:1726-1732.
132. Nabel E.G., Yang Z.Y., Plautz G., Forough R., Zhan X., Haudenschild C.C., et al.: Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* 1993 **362**:844-846.
133. Nakamura T., Nishizawa T., Hagiya M., Seki T., Shimonishi M., Sugimura A., et al.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 1989 **342**:440-443.
134. Nickoloff B.J., Mitra R.S., Varani J., Dixit V.M., Polverini P.J.: Aberrant production of interleukin-8 and thrombospondin-1 by psoriatic keratinocytes mediates angiogenesis. *Am J Pathol* 1994 **144**:820-828.
135. Nicosia R.F., Ottinetti A.: Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest* 1990 **63**:115-122.
136. O'Byrne K., Schally A.V., Thomas A., Carney D.N., Steward W.P.: Somatostatin, its receptors and analogs, in lung cancer. *Chemotherapy* 2001 **47 Suppl 2**:78-108.
137. Olofsson B., Korpelainen E., Pepper M.S., Mandriota S.J., Aase K., Kumar V., et al.: Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 **95**:11709-11714.
138. O'Reilly M.: Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *Exs* 1997 **79**:273-294.
139. O'Reilly M., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., et al.: Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 **88**:277-285.
140. Orlucevic A., Bechberger J., Green A.M., Shapiro R.A., Billiar T.R., Lala P.K.: Nitric-oxide production by murine mammary adenocarcinoma cells promotes tumor-cell invasiveness. *Int J Cancer* 1999 **81**:889-896.
141. Ozaki H., Okamoto N., Ortega S., Chang M., Ozaki K., Sadda S., et al.: Basic fibroblast growth factor is neither necessary nor sufficient for the development of retinal neovascularization. *Am J Pathol* 1998 **153**:757-765.

142. Park C.C., Morel J.C., Amin M.A., Connors M.A., Harlow L.A., Koch A.E.: Evidence of il-18 as a novel angiogenic mediator. *J Immunol* 2001 Aug 1 **167**:1644-1653.
143. Passaniti A., Taylor R.M., Pili R., Guo Y., Long P.V., Haney J.A., et al.: A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1992 **67**:519-528.
144. Perollet C., Han Z.C., Savona C., Caen J.P., Bikfalvi A.: Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998 **91**:3289-3299.
145. Pezzella F., Di Bacco A., Andreola S., Nicholson A.G., Pastorino U., Harris A.L.: Angiogenesis in primary lung cancer and lung secondaries. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2494-2500.
146. Pfeiffer A., Spranger J., Meyer-Schwickerath R., Schatz H.: Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 1997 **46 Suppl 2**:S26-30.
147. Poon R.T., Fan S.T., Wong J.: Clinical implications of circulating angiogenic factors in cancer patients. *J Clin Oncol* 2001 Feb 15 **19**:1207-1225.
148. Posey J.A., Khazaeli M.B., DelGrosso A., Saleh M.N., Lin C.Y., Huse W., et al.: A pilot trial of Vitaxin, a humanized anti-vitronectin receptor (anti alpha v beta 3) antibody in patients with metastatic cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2001 Apr **16**:125-132.
149. Prescott S.M., Zimmerman G.A., McIntyre T.M.: Platelet-activating factor. *J Biol Chem* 1990 **265**:17381-17384.
150. Rajkumar S.V., Witzig T.E.: A review of angiogenesis and antiangiogenic therapy with thalidomide in multiple myeloma. *Cancer Treat Rev* 2000 **26**:351-362.
151. Raza S.L., Cornelius L.A.: Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000 **5**:47-54.
152. Rivard A., Fabre J.E., Silver M., Chen D., Murohara T., Kearney M., et al.: Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* 1999 **99**:111-120.
153. Robinson G.S., Pierce E.A., Rook S.L., Foley E., Webb R., Smith L.E.: Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 **93**:4851-4856.
154. Roghani M., Mansukhani A., Dell'Era P., Bellosta P., Basilico C., Rifkin D.B., et al.: Heparin increases the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor but is not required for binding. *J Biol Chem* 1994 **269**:3976-3984.
155. Romagnani P., Annunziato F., Lasagni L., Lazzeri E., Beltrame C., Francalanci M., et al.: Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 2001 Jan **107**:53-63.
156. Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R., Sanborn T.A., Parikh M., Bergman G.W., et al.: Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999 **100**:468-474.
157. Ruegg C., Yilmaz A., Bieler G., Bamat J., Chaubert P., Lejeune F.J.: Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nat Med* 1998 **4**:408-414.

158. Sakamoto T., Ueno H., Sonoda K., Hisatomi T., Shimizu K., Ohashi H., et al.: Blockade of TGF-beta by in vivo gene transfer of a soluble TGF-beta type II receptor in the muscle inhibits corneal opacification, edema and angiogenesis. *Gene Ther* 2000 **7**:1915-1924
159. Sands B.E., Podolsky D.K.: New life in a sleeper: thalidomide and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999 **117**:1485-1488.
160. Sankar S., Mahooti-Brooks N., Bensen L., McCarthy T.L., Centrella M., Madri J.A.: Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during in vitro angiogenesis. *J Clin Invest* 1996 **97**:1436-1446.
161. Sato N., Beitz J.G., Kato J., Yamamoto M., Clark J.W., Calabresi P., et al.: Platelet-derived growth factor indirectly stimulates angiogenesis in vitro. *Am J Pathol* 1993 **142**:1119-1130.
162. Sawaoka H., Tsuji S., Tsujii M., Gunawan E.S., Sasaki Y., Kawano S., et al.: Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab Invest* 1999 **79**:1469-1477.
163. Schmassmann A.: Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 1998 **104**:43S-51S; discussion 79S-80S.
164. Schultz-Cherry S., Murphy-Ullrich J.E.: Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor-beta secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J Cell Biol* 1993 **122**:923-932.
165. Seftor R.E., Seftor E.A., Gehlsen K.R., Stetler-Stevenson W.G., Brown P.D., Ruoslahti E., et al.: Role of the alpha v beta 3 integrin in human melanoma cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 **89**:1557-1561.
166. Sgadari C., Angiolillo A.L., Tosato G.: Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 1996 **87**:3877-3882.
167. Sgadari C., Farber J.M., Angiolillo A.L., Liao F., Teruya-Feldstein J., Burd P.R., et al.: Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 1997 **89**:2635-2643.
168. Shalinsky D.R., Brekken J., Zou H., McDermott C.D., Forsyth P., Edwards D., et al.: Broad antitumor and antiangiogenic activities of AG3340, a potent and selective MMP inhibitor undergoing advanced oncology clinical trials. *Ann N Y Acad Sci* 1999 **878**:236-270.
169. Shawver L., Fong, T.A., Strawn, L.M., McMahon, G.: Flk-1 antagonists for inhibition of angiogenesis, in Hori W (ed): Therapeutic implications and mechanisms of angiogenesis, IBC's library series, 1996, p 241-247
170. Sheibani N., Frazier W.A.: Thrombospondin 1 expression in transformed endothelial cells restores a normal phenotype and suppresses their tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 **92**:6788-6792.
171. Sheu J.R., Yen M.H., Kan Y.C., Hung W.C., Chang P.T., Luk H.N.: Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-alpha(v)beta3 integrin monoclonal antibody. *Biochim Biophys Acta* 1997 **1336**:445-454.
172. Sirois M.G., Edelman E.R.: VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor. *Am J Physiol* 1997 **272**:H2746-2756.
173. Sledge G.W., Jr., Qulali M., Goulet R., Bone E.A., Fife R.: Effect of matrix metalloproteinase inhibitor batimastat on breast cancer regrowth and metastasis in athymic mice. *J Natl Cancer Inst* 1995 **87**:1546-1550.

174. Smith L.E., Kopchick J.J., Chen W., Knapp J., Kinose F., Daley D., et al.: Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science* 1997 **276**:1706-1709.
175. Smith L.E., Wesolowski E., McLellan A., Kostyk S.K., R D.A., Sullivan R., et al.: Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994 **35**:101-111.
176. Smyth A.P., Rook S.L., Detmar M., Robinson G.S.: Antisense oligonucleotides inhibit vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in normal human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1997 **108**:523-526.
177. Soker S., Machado M., Atala A.: Systems for therapeutic angiogenesis in tissue engineering. *World J Urol* 2000 **18**:10-18.
178. St Croix B., Rago C., Velculescu V., Traverso G., Romans K.E., Montgomery E., et al.: Genes expressed in human tumor endothelium. *Science* 2000 **289**:1197-1202.
179. Stromblad S., Becker J.C., Yebra M., Brooks P.C., Cheresch D.A.: Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin alphaVbeta3 during angiogenesis. *J Clin Invest* 1996 **98**:426-433.
180. Stubbs M.: Application of magnetic resonance techniques for imaging tumour physiology. *Acta Oncol* 1999 **38**:845-853.
181. Szabo S., Folkman J., Vattay P., Morales R.E., Pinkus G.S., Kato K.: Accelerated healing of duodenal ulcers by oral administration of a mutein of basic fibroblast growth factor in rats. *Gastroenterology* 1994 **106**:1106-1111.
182. Takahashi K., Mulliken J.B., Kozakewich H.P., Rogers R.A., Folkman J., Ezekowitz R.A.: Cellular markers that distinguish the phases of hemangioma during infancy and childhood. *J Clin Invest* 1994 **93**:2357-2364.
183. Talbot D.C., Brown P.D.: Experimental and clinical studies on the use of matrix metalloproteinase inhibitors for the treatment of cancer. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2528-2533.
184. Tamura M., Gu J., Tran H., Yamada K.M.: PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999 **91**:1820-1828.
185. Taraboletti G., Garofalo A., Belotti D., Drudis T., Borsotti P., Scanziani E., et al.: Inhibition of angiogenesis and murine hemangioma growth by batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. *J Natl Cancer Inst* 1995 **87**:293-298.
186. Thorn M., Raab Y., Larsson A., Gerdin B., Hallgren R.: Intestinal mucosal secretion of basic fibroblast growth factor in patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2000 **35**:408-412.
187. Tobe T., Ortega S., Luna J.D., Ozaki H., Okamoto N., Derevjani N.L., et al.: Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 1998 **153**:1641-1646.
188. Valente P., Fassina G., Melchiori A., Masiello L., Cilli M., Vacca A., et al.: TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis. *Int J Cancer* 1998 **75**:246-253.
189. Varda-Bloom N., Shaish A., Gonen A., Levanon K., Greenbereger S., Ferber S., et al.: Tissue-specific gene therapy directed to tumor angiogenesis. *Gene Ther* 2001 **8**:819-827.
190. Vasilias E.A., Kam L.Y., Abreu-Martin M.T., Hassard P.V., Papadakis K.A., Yang H., et al.: An open-label pilot study of low-dose thalidomide in chronically active, steroid-dependent Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999 **117**:1278-1287.

191. Veikkola T., Alitalo K.: VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999 **9**:211-220.
192. Vogel T., Guo N.H., Kruttsch H.C., Blake D.A., Hartman J., Mendelovitz S., et al.: Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin-binding domain and synthetic peptides from the type I repeats of thrombospondin. *J Cell Biochem* 1993 **53**:74-84.
193. Watson S.A., Morris T.M., Robinson G., Crimmin M.J., Brown P.D., Hardcastle J.D.: Inhibition of organ invasion by the matrix metalloproteinase inhibitor batimastat (BB-94) in two human colon carcinoma metastasis models. *Cancer Res* 1995 **55**:3629-3633.
194. Webster K.A.: Therapeutic angiogenesis: a case for targeted, regulated gene delivery. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2000 **10**:113-125.
195. Weidner N.: Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat* 1995 **36**:169-180.
196. Weidner N.: Intratumoral vascularity as a prognostic factor in cancers of the urogenital tract. *Eur J Cancer* 1996 **32A**:2506-2512.
197. Weinstat-Saslow D.L., Zabrenetzky V.S., VanHoutte K., Frazier W.A., Roberts D.D., Steeg P.S.: Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential, and angiogenesis. *Cancer Res* 1994 **54**:6504-6511.
198. Williams J.K., Armstrong M.L., Heistad D.D.: Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis. *Circ Res* 1988 **62**:515-523.
199. Witte L.: Identifying inhibitors of receptors/ligand interactions involved in angiogenesis, in Hori W (ed): Therapeutic implications and mechanisms of angiogenesis, IBC's library series, 1996, p 251-257
200. Yip D., Ahmad A., Karapetis C.S., Hawkins C.A., Harper P.G.: Matrix metalloproteinase inhibitors: applications in oncology. *Invest New Drugs* 1999 **17**:387-399.
201. Yoshida A., Yoshida S., Ishibashi T., Inomata H.: Intraocular neovascularization. *Histol Histopathol* 1999 **14**:1287-1294.
202. Yoshida S., Ono M., Shono T., Izumi H., Ishibashi T., Suzuki H., et al.: Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997 **17**:4015-4023.
203. Zawicki D.F., Jain R.K., Schmid-Schoenbein G.W., Chien S.: Dynamics of neovascularization in normal tissue. *Microvasc Res* 1981 **21**:27-47.
204. Zhang L., Yu D., Hu M., Xiong S., Lang A., Ellis L.M., et al.: Wild-type p53 suppresses angiogenesis in human leiomyosarcoma and synovial sarcoma by transcriptional suppression of vascular endothelial growth factor expression. *Cancer Res* 2000 **60**:3655-3661.
205. Zhang Y., Griffith E.C., Sage J., Jacks T., Liu J.O.: Cell cycle inhibition by the anti-angiogenic agent TNP-470 is mediated by p53 and p21WAF1/CIP1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 **97**:6427-6432.
206. Zhao L.L., Davidson J.D., Wee S.C., Roth S.I., Mustoe T.A.: Effect of hyperbaric oxygen and growth factors on rabbit ear ischemic ulcers. *Arch Surg* 1994 **129**:1043-1049.

207. Ziche M., Morbidelli L., Choudhuri R., Zhang H.T., Donnini S., Granger H.J., et al.: Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997 **99**:2625-2634.
208. Ziesche R., Hofbauer E., Wittmann K., Petkov V., Block L.H.: A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1999 **341**:1264-1269.

BIBLIOGRAPHICAL STUDY OF REACTIONAL ANGIOGENESIS DYSFUNCTIONS AND THERAPEUTIC PROSPECTS

SURNAME : BLESSON

Given name : Séverine

SUMMARY :

Reactional angiogenesis is a mechanism of vascular remodelling and neovessel growth. It involves endothelial cells, pericytes, perivascular smooth muscle cells, extracellular matrix, as well as a complex network of regulation mediators. Different study models have been elaborated from cells in vitro culture to surgical induced ischemia or tumor transplantation, each being associated with a specific way of quantification aimed at following the angiogenetic phenomenon, in vitro and in vivo. Many strategies of investigation are used to decipher each protagonist part (recombinant proteins, blocking antibodies, gene therapy...), strategies used as well later in therapeutic models.

The regulation elements of angiogenesis are growth factors (like VEGF and FGF), cytokines, chemokines and adhesion molecules. Each of these substance family has pro-angiogenic and anti-angiogenic members : the balance between these mediators allows the system to stay between the physiological limits.

Any disturbance of this balance is susceptible to induce a pathological state. A lack of angiogenesis can lead to cicatrisation defects, ulcers and ischemic muscular diseases. Conversely, any excess can cause retinopathies and accelerated development of cancers. The therapeutic attempts are numerous, especially in the cancer domain, and in the domain of ischemic tissues revascularisation where the results are very encouraging.

KEY WORDS : angiogenesis – neovessel – ischemia – tumor - vascular endothelial growth factor - cytokines

JURY :

President	Pr.
Director	Pr. CRESPEAU F.
Assessor	Pr. COMBRISSE H.

Author's adress :

35 Rue des Pierrettes
92320 CHATILLON

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE L'ANGIOGENESE REACTIONNELLE DYSFONCTIONNEMENTS ET PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES

NOM : BLESSON

Prénom : Séverine

RESUME :

L'angiogenèse réactionnelle est un mécanisme de remaniement du réseau vasculaire, qui concerne la croissance des néovaisseaux. Elle met en jeu les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules musculaires lisses périvasculaires et la matrice extracellulaire, ainsi que tout un ensemble de médiateurs qui assurent la régulation du processus. Différents modèles d'étude ont été mis au point, de la culture de cellules in vitro à des modèles d'ischémie chirurgicale ou des greffes de tumeurs, chacun étant associé à une technologie de quantification destinée à suivre l'évolution du phénomène angiogénétique in vitro et in vivo. De nombreuses stratégies sont utilisées pour décrypter le rôle de chaque protagoniste du système (protéines recombinantes, anticorps bloquants, thérapie génique...), stratégies utilisées par la suite dans les modèles thérapeutiques.

Les éléments de régulation de ce phénomène sont constitués de facteurs de croissance (dont le VEGF et le FGF), de cytokines, de chémokines, et de molécules d'adhésion. Chacun de ces groupes de substances comporte des membres pro-angiogéniques et anti-angiogéniques : c'est l'équilibre entre ces différents médiateurs qui permet au système de se maintenir dans les limites physiologiques.

Toute perturbation de cet équilibre est susceptible d'engendrer un état pathologique. Un déficit d'angiogenèse peut aboutir à des anomalies de la cicatrisation, à des ulcères et aux maladies musculaires ischémiques ; à l'inverse, un excès peut conduire à des rétinopathies et au développement accéléré de cancers. Les tentatives thérapeutiques sont nombreuses, notamment dans le domaine du cancer, ainsi que dans le domaine de la revascularisation de tissus ischémiques où les résultats sont très encourageants.

MOTS CLES : angiogenèse - néovaisseaux - ischémie – tumeur - facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) - cytokines

JURY :

Président	Pr.
Directeur	Pr. CRESPEAU F.
Assesseur	Pr. COMBRISON H.

Adresse de l'auteur :

35 Rue des Pierrettes
92320 CHATILLON