

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie



A

Ex. 3

Thèse n° 305

Sicil 216'030

Année 1990

STRATEGIE POUR LA CONCEPTION D'UN  
INHIBITEUR DE L'ANGIOGENESE TUMORALE

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement le 26 mars 1990

par

O l i v i e r L A M A R E

Né le 17 mars 1957

EXAMINATEURS DE LA THESE

Monsieur le Professeur GALEN, Président  
Madame LARTIGUE, Maître de Conférences, Juge  
Monsieur CRESPO, Laboratoire RHONE-POULENC SANTE, Juge

Année 1990



U N I V E R S I T E   D E   L I M O G E S

---

F A C U L T E   D E   P H A R M A C I E

---

- DOYEN de la FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er Assesseur)  
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

• PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

*A Monsieur le Professeur GALEN, Professeur des  
Universités de Physiologie, pour m'avoir fait l'honneur  
d'accepter de présider ce Jury.*

A Madame le Docteur LARTIGUE, Maître de Conférence  
de Pharmacodynamie, pour avoir accepté de diriger ce travail.

A Monsieur le Docteur CRESPO, Chef de Service du Laboratoire de Biologie cellulaire des Laboratoires THONE POULENC SANTE, pour m'avoir soutenu par ses conseils dans la réalisation de cette thèse.

A ma femme,

A mes enfants,

A toute ma famille et ma belle famille

# S O M M A I R E

\*\*\*\*\*

INTRODUCTION	Page 06
1.1.1. Définition	08
1.1.2. Evénements physiologiques et pathologiques dans lesquels l'angiogénèse est impliquée	08
1.2. RAPPELS SUR LA STRUCTURE DES CAPILLAIRES	10
1.2.1. L'endothelium	11
1.2.2. La membrane basale	12
1.2.2.1. Le collagène de type IV	12
1.2.2.2. Les molécules d'attachement non collagéniques	12
1.2.2.2.1. La laminine	13
1.2.2.2.2. Le nidogène	13
1.2.2.2.3. Les héparanes sulfates protéoglycones	13
1.2.3. La matrice extracellulaire sous endothéliale	14
1.2.3.1. Le collagène de type III	14
1.2.3.2. La fibronectine	14
1.3. LA SEQUENCE DES EVENEMENTS AU COURS DE L'ANGIOGENESE	15
1.3.1. Origine	18
1.3.2. Activation	18
1.3.3. Migration	18
1.3.4. Prolifération	19



1.3.5.	Formation de la lumière capillaire	Page 19
1.3.6.	Maturation	20
2.	LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE L'ANGIOGENESE	22
2.1.	LES TECHNIQUES IN VIVO	22
2.1.1.	Le modèle de la membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné	22
2.1.1.1.	Préparation de l'embryon	23
2.1.1.1.1.	Techniques de préparation in ovo	23
2.1.1.1.2.	Techniques de préparation in vitro	25
2.1.1.2.	Préparation et dépôt de l'échantillon	27
2.1.1.3.	Mesure de l'effet angiogénique	28
2.1.1.4.	Interprétation des résultats	34
2.1.1.5.	Conclusions	35
2.1.2.	Le modèle de la cornée	36
2.1.3.	Autres tests in vivo	39
2.2.	LES TECHNIQUES IN VITRO	40
2.2.1.	Isolement des cellules endothéliales capillaires	41
2.2.2.	Maintien des cellules en culture	41
2.2.3.	Hétérogénéité relative des cellules capillaires	42
2.2.4.	Modifications phénotypiques des cellules en culture	45
2.2.5.	Phénomènes biologiques liés à l'angiogenèse et quantifiables dans les essais in vitro	46
2.2.5.1.	Secrétion de protéases	46
2.2.5.2.	Migration des cellules endothéliales	47

2.2.5.2.1.	La chambre de Boyden	Page 47
2.2.5.2.2.	Phagocinétisme cellulaire	48
2.2.5.2.3.	Cicatrisation in vitro	48
2.2.5.2.4.	Migration en gel d'agarose	49
2.2.5.3.	Prolifération des cellules endothéliales	49
2.2.5.3.1.	Mesure de l'incorporation de thymidine marquée	49
2.2.5.3.2.	Comptage cellulaire	50
3.	LES EFFECTEURS ANGIOGENIQUES	51
3.1.	LES EFFECTEURS CELLULAIRES	51
3.1.1.	Les cellules non transformées pouvant être impliquées dans l'angiogenèse tumorale	51
3.1.1.1.	Les lymphocytes	51
3.1.1.2.	Les macrophages	53
3.1.1.3.	Les plaquettes	55
3.1.1.4.	Les cellules mastocytaires	56
3.1.1.5.	Les cellules endothéliales	57
3.1.2.	Rôle des cellules cancéreuses dans l'angiogenèse tumorale	57
3.2.	LES EFFECTEURS MOLECULAIRES	60
3.2.1.	Membrane basale et matrice extra cellulaire	60
3.2.2.	Protéases et autres enzymes associées à l'angiogenèse	64
3.2.2.1.	Protéases sécrétées par les cellules endothéliales	64
3.2.2.2.	Protéases et autres enzymes sécrétées par	66

les cellules non endothéliales associées à l'angiogénèse	Page 66
3.2.3. Le "Fibroblast Growth Factor"	67
3.2.4. Les "Transforming Growth Factors" de type $\beta$	75
3.2.5. Le "Transforming Growth Factor" de type $\alpha$	79
3.2.6. L'angiogénine	82
3.2.7. Le "Tumor Necrosif Factor" TNF	84
3.2.8. Le facteur angiogénique des plaquettes ou PDEC GF	86
3.2.9. L'angiotropine	87
3.2.1.0. Conclusion	88
3.3. LES COFACTEURS DE L'ANGIOGENESE	91
3.3.1. L'héparine	91
3.3.2. Le cuivre	94
3.3.3. Les lipides	95
4. EXTRAITS TISSULAIRES ET MOLECULES INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE	97
4.1. EXTRAITS TISSULAIRES OU CELLULAIRES	97
4.1.1. Tissus avasculaires	97
4.1.1.1. Humeur vitrée	97
4.1.1.2. Le cartilage	99
4.1.2. Péricytes	100
4.2. LES MOLECULES INHIBITRICES DE L'ANGIOGENESE	101
4.2.1. Les stéroïdes angiostatiques	101

4.2.2.	Le sulfate de protamine	Page 105
4.2.3.	L'interféron	106
5.	DISCUSSION	108
	CONCLUSION	113
	BIBLIOGRAPHIE	114

## I N T R O D U C T I O N

Malgré les progrès réalisés ces vingt dernières années en cancérologie, il n'est pas toujours possible de combattre efficacement l'évolution de la maladie : la radiothérapie n'est efficace que sur les tumeurs superficielles.

La chirurgie, souvent invalidante, n'élimine pas toutes les métastases.

Les drogues anticancéreuses ont un index thérapeutique faible qui ne permet pas d'enrayer la prolifération des tumeurs résistantes.

Face à la nécessité de disposer de traitements plus efficaces, de nouvelles approches thérapeutiques ont été développées. Celles-ci consistent à :

- augmenter les défenses immunitaires vis à vis des cellules cancéreuses,
- inhiber l'expression et le produit des oncogènes,
- inhiber la néovascularisation des tumeurs.

C'est cette dernière stratégie que nous avons choisi d'étudier. Elle nous semble particulièrement intéressante car il a été prouvé expérimentalement que, d'une part, la croissance de toute tumeur solide est dépendante de la néovascularisation qu'elles provoquent par la sécrétion de facteurs solubles, et que, d'autre part, la vascularisation est indispensable à la dissémi-

nation des cellules tumorales qui permet le développement des métastases.

Dans ces conditions, il est raisonnable de développer une recherche permettant la conception d'un inhibiteur de la néovascularisation. Celui-ci aura à la fois pour effet de bloquer la croissance tumorale et d'empêcher la formation de métastases.

La conception d'une telle molécule ne peut être entreprise qu'après avoir évalué la possibilité d'inhiber spécifiquement la néovascularisation tumorale. Pour que cette évaluation soit la plus juste possible, il est nécessaire de faire le point sur les connaissances bibliographiques concernant ce sujet.

La première partie de ce travail est une description de la cellule endothéliale, de son environnement et des modifications phénotypiques de ces cellules au cours de la néovascularisation.

Dans une deuxième partie, nous décrirons les principales techniques utilisables en laboratoire, qui permettent de mieux comprendre le phénomène d'angiogenèse et d'apprécier l'efficacité de tel ou tel inhibiteur.

Dans la troisième partie, nous faisons le point sur les connaissances actuelles concernant les effecteurs impliqués dans l'angiogenèse et qui constituent la cible privilégiée pour un inhibiteur.

En conclusion, nous proposerons quelques axes de recherches qui, selon nous, permettraient d'aboutir à la conception d'un inhibiteur efficace de l'angiogenèse tumorale.

### 1.1.1. DEFINITION

L'angiogénèse (gr. angeion = vaisseaux; genesis = naissance, formation) est l'ensemble des phénomènes aboutissant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins consécutifs à la migration et à la prolifération des cellules endothéliales des capillaires préexistants.

Si le terme angiogénèse a été introduit pour la première fois par Hertig en 1935, c'est dès le milieu du XVIIIème siècle que l'on commence à décrire les étapes de ce phénomène au cours de la cicatrisation (Hudlicka, 1984).

Les premières observations concernant la vascularisation abondante et anarchique des tumeurs sont attribuées à Virchows (Warren 1979). Et c'est la poursuite des études sur l'angiogénèse associée aux tumeurs qui a permis de montrer que la croissance tumorale est dépendante de sa vascularisation (Folkman 1972), qu'elle provoque par la sécrétion de facteurs solubles (Green, Blatt et Shubick 1968).

### 1.1.2. EVENEMENTS PHYSIOLOGIQUES ET PATHOLOGIQUES DANS LESQUELS L'ANGIOGENESE EST IMPLIQUEE

Bien que le but de ce travail soit l'étude de l'angiogénèse tumorale, il nous a semblé intéressant de résumer dans les tableaux ci-après l'ensemble des phénomènes physiologiques et pathologiques dans lesquels est impliquée l'angiogénèse.

Si l'on considère que la cancérisation est une déviation des processus normaux de croissance et de réparation tissulaire, on admet que l'étude de ces mécanismes permet de mieux comprendre l'angiogenèse tumorale.

OPHTALMOLOGIE

- . Rétinopathie diabétique
- . Néovascularisation de la greffe de la cornée
- . Glaucome néovasculaire
- . Trachome
- . Fibroplastie rétrolentale

DERMATOLOGIE

- . Psoriasis
- . Granulome pyogénique

CARDIOLOGIE

- . Plaque d'athérosclérose

PEDIATRIE

- . Hémangiome
- . Angiofibrome
- . Articulation hémophyle

CHIRURGIE

- . Adhésion vasculaire
- . Cicatrisation hypertrophique

CANCEROLOGIE

- . Toute tumeur solide



TABLEAU I (page précédente) - Phénomènes pathologiques associés à une activation de l'angiogenèse

Fracture non consolidée
Cicatrisation retardée
Sclérodermie

TABLEAU II - Phénomènes pathologiques associés à une déficience de l'angiogenèse

Embryogenèse où se mêlent vasculogenèse et angiogenèse
Croissance tissulaire
Cicatrisation
Maturation du corps jaune
Vascularisation de l'endomètre
Vascularisation des follicules du cuir chevelu
Adaptation musculaire à l'exercice intensif et à la haute altitude

TABLEAU III - Phénomènes physiologiques dans lesquels l'angiogenèse est impliquée

### 1.2. - RAPPELS SUR LA STRUCTURE DES CAPILLAIRES

\*\*\*\*\*

La paroi des vaisseaux capillaires est organisée en trois couches :

- L'endothélium

- La membrane basale
- Les tissus conjonctifs péricapillaires

#### 1.2.1. L'ENDOTHELIUM

L'endothélium est constitué d'une monocouche continue de cellules reliées par des jonctions intercellulaires. La surface apicale des cellules endothéliales est recouverte d'une enveloppe riche en protéoglycans. Ces cellules se distinguent par la présence dans le cytoplasme d'une structure connue sous le nom de Weibel Palade qui est un lieu de stockage du facteur Willebrand.

Les cellules endothéliales régulent le transport des métabolites et des cellules immunitaires entre la lumière vasculaire et les tissus. De plus, elles jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'hémostase.

Il est important de noter que les cellules endothéliales ne forment pas une population strictement homogène tant au niveau structurel que fonctionnel. Ainsi, les jonctions intercellulaires peuvent être très étroites pour les capillaires des muscles squelettiques ou très lâches pour les capillaires hépatiques.

On connaît aussi des structures capillaires beaucoup plus différenciées :

- Cellules endothéliales des capillaires et des veinules du système nerveux central formant la barrière hématoencéphalique.
- Cellules endothéliales des veinules, localisées dans les gan-

glions lymphatiques et les tissus lymphoïdes, dans les poumons et le tractus digestif, très perméables aux lymphocytes.

Dans les deux cas cités, la différenciation est sous le contrôle des tissus environnants (Jauzer et Raff 1987; Kraal et al. 1987).

D'autres auteurs ont pu montrer, grâce à des sondes immunologiques ou à des lectines, que les cellules endothéliales avaient des propriétés caractéristiques suivant les organes et qu'in vitro les cellules isolées d'une tumeur fixaient préférentiellement les cellules endothéliales de l'organe dont elles étaient issues (Auerbach 1987).

#### 1.2.2. LA MEMBRANE BASALE

##### 1.2.2.1. Le collagène de type IV

La membrane basale renferme un collagène de type IV caractéristique qui joue un rôle de soutien, mais qui est aussi impliqué dans le mécanisme de différenciation des cellules endothéliales. Il fixe la laminine et serait en partie responsable du maintien des cellules dans leur phénotype différencié (Form et al. 1986).

##### 1.2.2.2. Les molécules d'attachement non collagéniques

Ces molécules sont des glycoprotéines, et parmi toutes celles qui ont pu être identifiées, deux seulement sont considé-

rées comme spécifiques des membranes basales. Il s'agit de la laminine et du nidogène.

1.2.2.2.1. La laminine

La laminine joue un rôle essentiel de médiateur dans la liaison des cellules endothéliales ou collagène de type IV de la membrane basale.

1.2.2.2.2. Le nidogène

Le nidogène est présent dans la membrane basale en quantité à peu près égale à la laminine. Il possède deux sites de liaison : l'un pour la laminine et l'autre pour le collagène de type IV, et joue donc un rôle majeur dans les interactions laminine/collagène (Timpi et al. 1988).

1.2.2.2.3. Les héparanes sulfates protéoglycanes

Ils existent sous des formes variées, très riches en groupements sulfates et carboxyles; ils sont responsables de la charge électronégative de la membrane basale. Ils participent à la régulation du passage des macromolécules à travers la membrane basale. Les héparanes sulfates protéoglycanes forment des agrégats qui associent la fibronectine au collagène de type IV et à la laminine, et assure également la liaison de la cellule endothéliale au collagène de type III de la matrice extracellulaire.

1.2.3. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SOUS ENDOTHELIALE

### 1.2.3. LA MATRICE EXTRACELLULAIRE SOUS ENDOTHELIALE

La matrice extracellulaire est constituée essentiellement de collagène de type III, de protéoglycanes et de fibronectine.

#### 1.2.3.1. Le collagène de type III

Le collagène de type III constitue un facteur d'attachement nécessaire à la prolifération des cellules endothéliales en présence des facteurs de croissance.

#### 1.2.3.2. La fibronectine

La fibronectine est un constituant indispensable à l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire. On la retrouve à la fois dans la membrane basale et dans la matrice extracellulaire du sous endothélium. La fibronectine se lie aux collagènes de différents types, mais plus particulièrement au collagène de type III.

En second lieu, la fibronectine se lie aux protéoglycanes de type glycosaminoglycane (Héparine, héparane, sulfate et acide hépaluronique).

Il existe une troisième sorte de liaison établie avec les éléments de la surface cellulaire.

En dehors de leur rôle de soutien, les molécules de la membrane basale et de la matrice extracellulaire jouent un rôle essentiel, mais encore mal compris, dans les phénomènes de prolifé-

ration et de différenciation cellulaire impliqués dans l'angiogénèse (Furcht 1986). Cet aspect dynamique sera développé ultérieurement et la figure 1 ci-après met en évidence le rôle statique des constituants précédemment décrits.

1.3. LA SEQUENCE DES EVENEMENTS AU COURS DE L'ANGIOGENESE  
\*\*\*\*\*

In vivo, le taux de multiplication des cellules endothéliales est très faible. Des études de l'activité mitotique de ces cellules utilisant la thymidine tritiée, montrent que s'il existe de légères différences entre les tissus (Engerman et al. 1967), la proportion de cellules qui incorporent la thymidine marquée est en moyenne de 0,1% (Folkman et Cotran 1976).

Par contre, lorsque les cellules endothéliales sont mises en présence d'inducteurs de l'angiogénèse, le taux d'incorporation de thymidine peut atteindre des valeurs comprises entre 10 et 20% (Denekamp 1984). La mesure du taux d'incorporation de thymidine marquée permet de calculer le temps de renouvellement moyen des cellules endothéliales, et la figure 2 utilise ce paramètre pour mettre en évidence l'activité mitotique des cellules endothéliales en situation normale et pathologique.

Par rapport à l'état physiologique des cellules endothéliales, l'angiogénèse provoque une modification suffisamment importante du caractère de ces cellules pour que l'on puisse étudier facilement la séquence d'événements qui aboutissent à la formation de nouveaux vaisseaux.

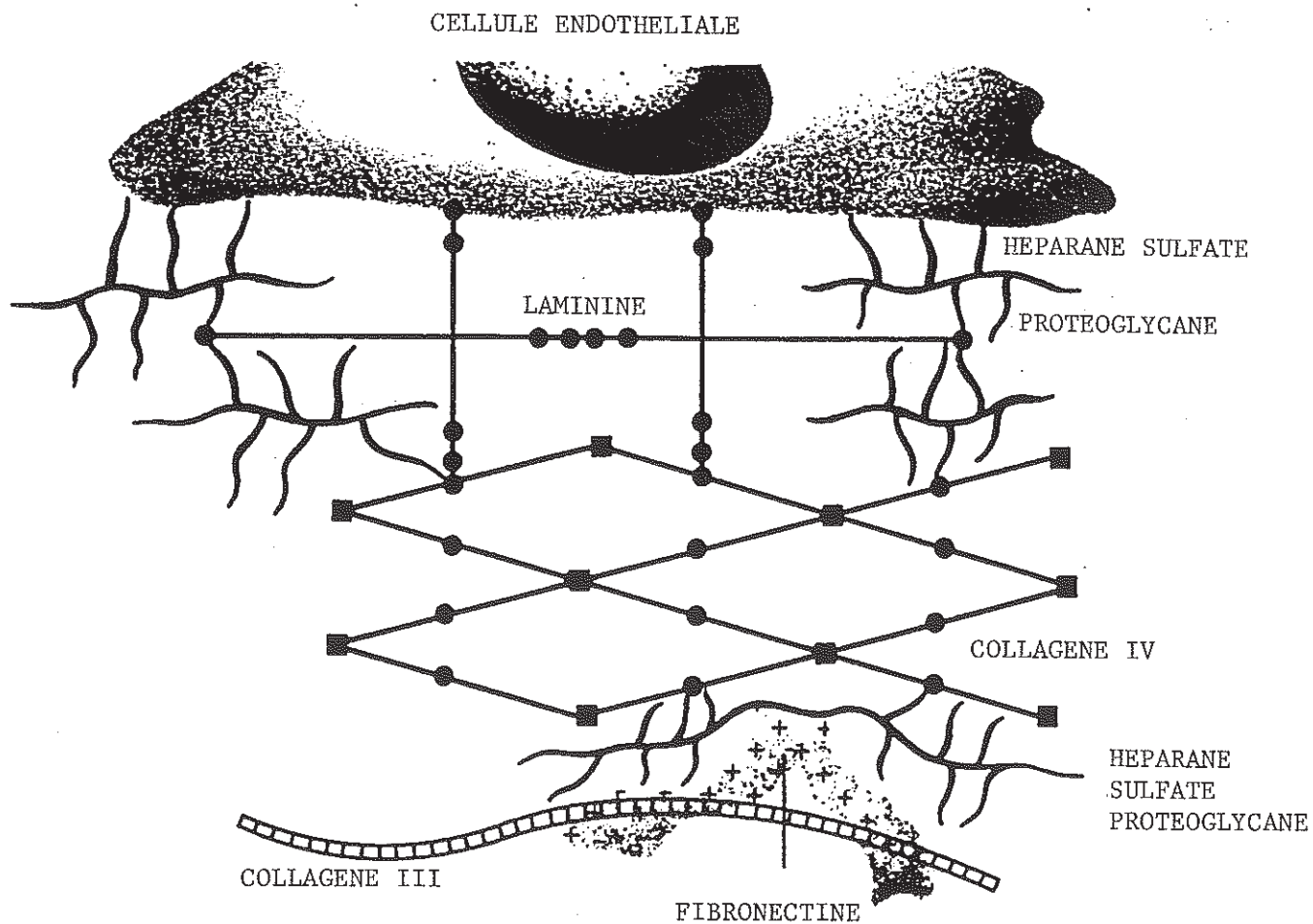


FIGURE 1 - Organisation moléculaire de la membrane basale et de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales.

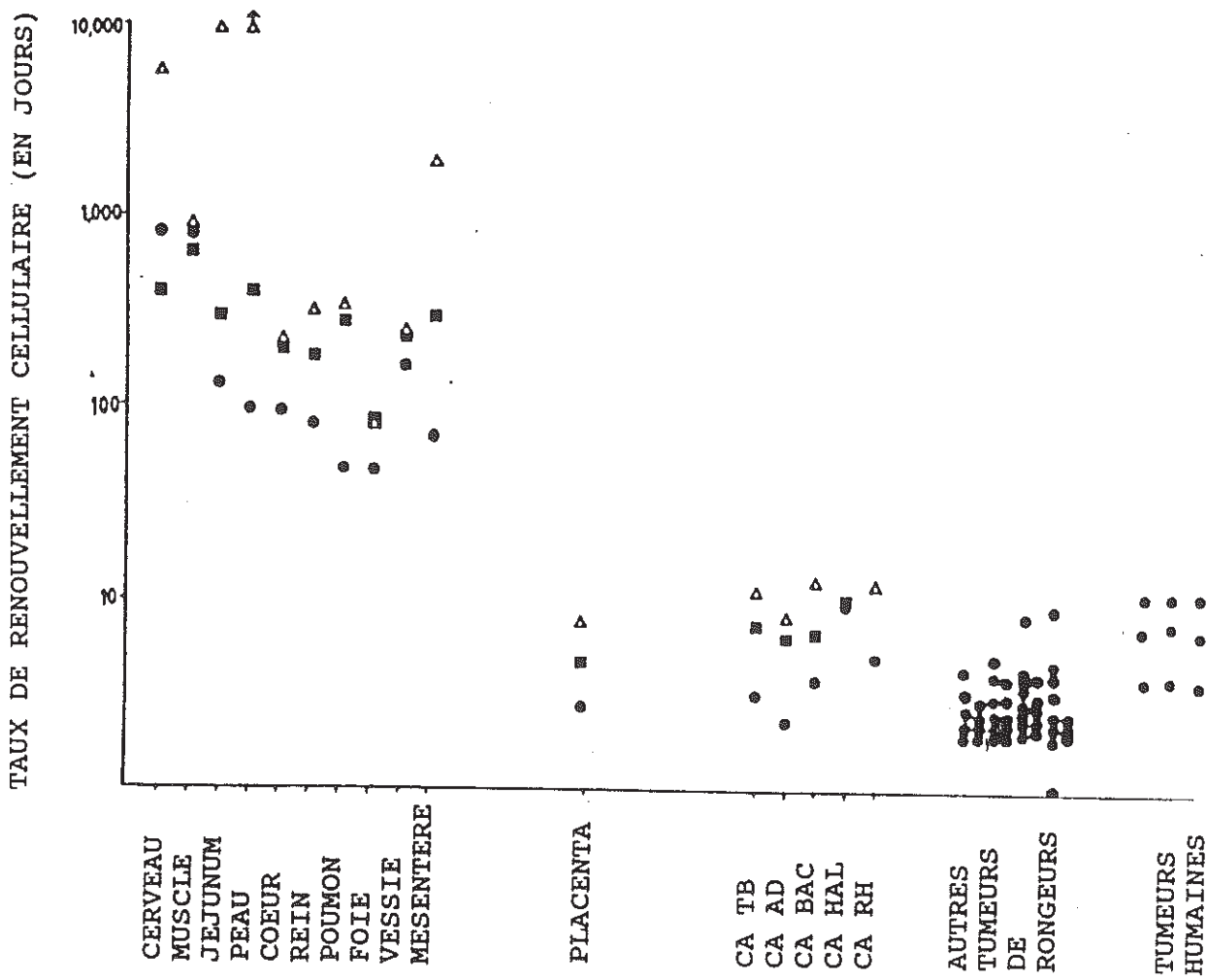


FIGURE 2 - Temps de renouvellement moyen des cellules endothéliales en situation normale et pathologique (d'après Denekamp, 1984).



Ces études ont surtout été effectuées en présence de tumeurs ou de facteurs solubles qui en sont extraits et qui sont de puissants inducteurs de l'angiogenèse. Quelles que soient les circonstances induisant l'angiogenèse, le mécanisme est fondamentalement identique.

#### 1.3.1. ORIGINE

Les observations microscopiques prouvent que les capillaires néoformés sont exclusivement issus de capillaires ou de veinules préexistants (Cliff 1963).

#### 1.3.2. ACTIVATION

L'activation des cellules endothéliales des microvaisseaux, qui est à l'origine de la néovascularisation, se caractérise par la multiplication des organites intracytoplasmiques (Wagner 1980). La surface cellulaire apicale présente de nombreuses villosités. La membrane basale est fragmentée et on peut observer, dans le tissu conjonctif périvasculaire, les premiers pseudopodes endothéliaux dirigés vers l'inducteur angiogénique (Ausprunk et Folkman 1937).

#### 1.3.3. MIGRATION

Les cellules endothéliales migrent ensuite dans l'espace périvasculaire dont la structure est altérée. Cette migration est rendue possible grâce à la rupture des jonctions intercellulaires, à la dégradation de la matrice extracellulaire et de la mem-

brane basale par des enzymes protéolytiques secrétées par les cellules endothéliales en réponse au stimulus angiogénique (Moscatelli et Rifkin 1988).

Les observations microscopiques montrent que la migration des cellules endothéliales du capillaire parent précède la mitose cellulaire (Ausprunk et Folkman 1977). Des expériences utilisant les rayons X pour supprimer l'activité mitotique des cellules endothéliales ont montré que le bourgeonnement vasculaire initial ne nécessite pas de prolifération et utilise les cellules endothéliales du capillaire parent (Sholley et al. 1984).

#### 1.3.4. PROLIFERATION

Après induction de la migration, la prolifération des cellules endothéliales est mise en évidence au niveau du capillaire parent et du capillaire en formation, mais uniquement en amont du front de migration. Les cellules de l'extrémité aval ne se divisant pas (Folkman 1982). Il est fort probable que les mouvements migratoires des cellules endothéliales, qui ont pour conséquence une perte des structures de jonction intercellulaire, participent au processus mitotique (Ausprunk et Folkman 1977).

#### 1.3.5. FORMATION DE LA LUMIERE CAPILLAIRE

Le mécanisme de cette étape est le moins bien connu. Seules les observations microscopiques de cellules endothéliales capillaires cultivées in vitro permettent d'étudier ce phénomène.

D'après Folkman et Handenschild (1980), il semble que la

lumière capillaire se forme par la fusion des vacuoles de plusieurs cellules, formant ainsi un tube en connexion avec la lumière des vaisseaux préexistants. La cellule endothéliale entoure ainsi la lumière capillaire sans qu'il y ait interruption du cytoplasme. La structure vacuolaire se transforme peu à peu en structure luminale tapissée des constituants extracellulaires synthétisés par la cellule endothéliale.

#### 1.3.6. MATURATION

Les capillaires néoformés peuvent s'interconnecter pour former des boucles. La formation de ces boucles permet à la circulation sanguine de s'installer dans ces nouveaux capillaires. Ces boucles peuvent être elles-mêmes à l'origine de la formation de néovaisseaux qui aboutiront à la constitution d'un plexus capillaire (Folkman 1982).

La maturation s'achève par la différenciation cellulaire complète et la constitution d'une matrice extracellulaire propre aux vaisseaux capillaires (Wagner 1980).

Autour du capillaire néoformé viennent s'associer des péricytes. Les péricytes sont des cellules dérivées des cellules musculaires lisses (Sims 1986). Ils semblent participer à la maturation des néovaisseaux. D'Amore et Orledge (1987) ont montré que les péricytes en culture inhibent la croissance des cellules endothéliales. Cette inhibition n'a lieu que s'il existe un contact étroit entre les deux types cellulaires, ce qui exclut l'existence d'un inhibiteur soluble synthétisé par des péricytes.

Par ailleurs, les péricytes jouent un rôle dans la synthèse de la matrice extracellulaire (Sims 1986).

2. LES MODELES EXPERIMENTAUX D'ETUDE DE L'ANGIOGENESE

De nombreux modèles in vivo ont été utilisés pour étudier le processus de néovascularisation.

Ces modèles ont un grand intérêt dans l'étude descriptive et morphologique de l'angiogenèse; ils ont parfois été utilisés pour suivre la purification de facteurs angiogéniques (Fett et al. 1985). Cependant, ces techniques sont laborieuses, longues, et ne permettent pas une quantification très précise d'une activité angiogénique.

Pour pallier ces difficultés, des techniques in vitro ont été développées. Basées sur la culture des cellules endothéliales, elles permettent l'étude détaillée et la quantification des phénomènes impliqués dans l'angiogenèse (prolifération, migration, synthèse de protéases).

2.1. LES MODELES IN VIVO

\*\*\*\*\*

2.1.1. LE MODELE DE LA MEMBRANE CHORIOALLANTOÏQUE D'OEUF EMBRYONNE

Cette technique est couramment proposée pour tester l'activité angiogénique de fragments tissulaires (Vu et al. 1985). Son utilisation répond à la nécessité de disposer d'une technique permettant de tester un nombre important de substances à un coût financier et utilitaire raisonnable. Ce modèle, très utili-

sé dans les études embryologiques, a été développé par l'équipe de J. Folkman pour étudier la vascularisation tumorale (Ausprunk et al. 1975).

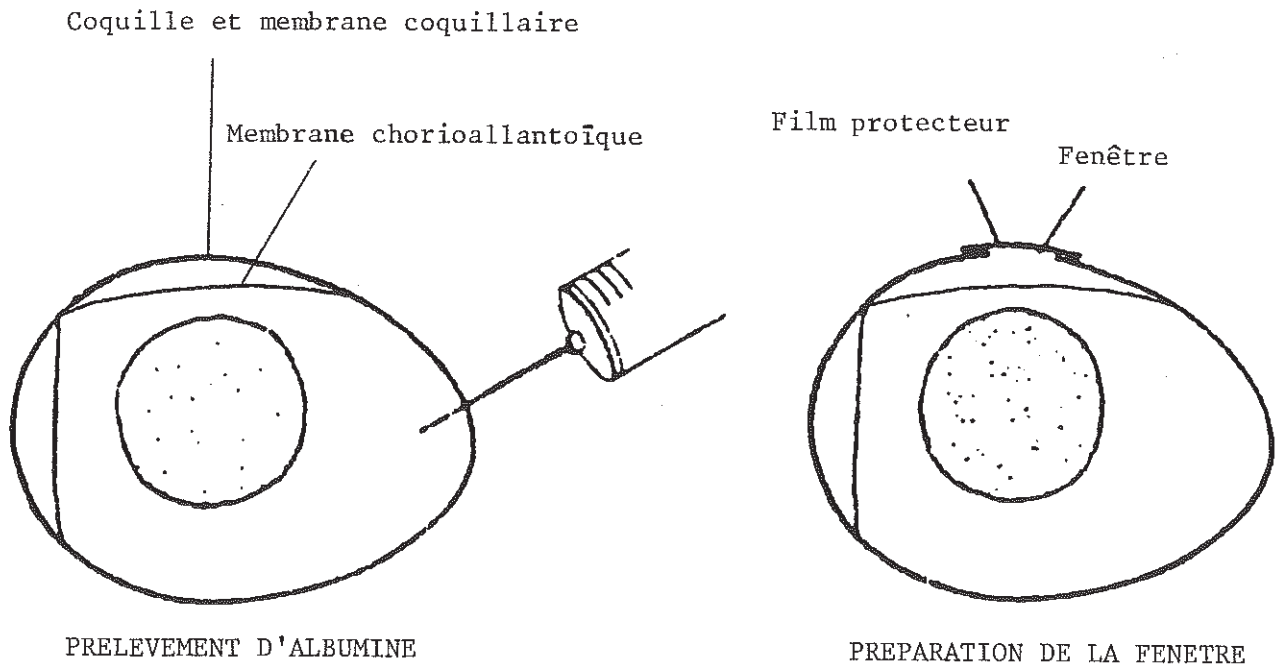
#### 2.1.1.1. Préparation de l'embryon

##### 2.1.1.1.1. Technique de préparation in ovo

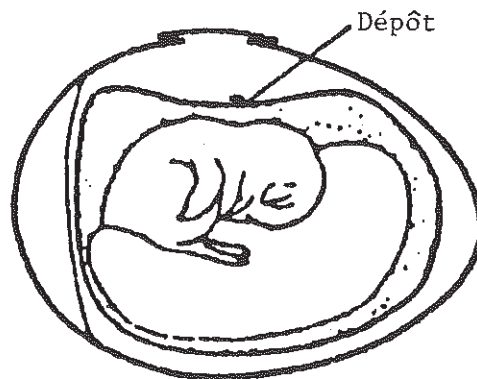
C'est la technique couramment proposée et dont les principales étapes sont schématisées dans la figure 3. Les oeufs de poule embryonnés sont mis à incuber horizontalement à 37°C, dans une atmosphère à 60% d'humidité relative pendant trois jours (Vu et al. 1985). Le troisième jour, les oeufs sont lavés avec une solution désinfectante, puis une ponction de trois à quatre millilitres d'ovalbumine est effectuée à l'extrémité opposée à la chambre à air (Knighton et al. 1977). Cette ponction permet d'aménager une poche d'air à la face supérieure de l'oeuf qui décolle la membrane chorioallantoïque de la paroi coquillière.

Une fenêtre de un à deux centimètres carrés est découpée dans la paroi coquillière au dessus de la poche d'air. Sous hotte à flux laminaire, la coquille et la membrane coquillière de cette fenêtre sont enlevées à l'aide de pinces.

Cette opération est la plus délicate. Il est en effet impératif d'éviter l'introduction de poussières ou de fragments de coquille sur la membrane chorioallantoïque. Ces débris provoquent une violente réaction inflammatoire angiogénique rendant impossible l'interprétation des résultats (Jakob et al. 1978).



PREPARATION DE L'OEUF EMBRYONNE AGE DE TROIS JOURS



DEPOT SUR LA MEMBRANE CHORIOALLANTOÏQUE SUR L'OEUF EMBRYONNE AGE DE 13 JOURS

FIGURE 3 - Préparation de l'embryon in ovo

La fenêtre est recouverte d'un film de cellophane qui protège la membrane chorioallantoïque et évite le dessèchement de l'embryon.

L'oeuf est ensuite remis à incuber pendant une semaine avant le dépôt de la substance à tester. Cette période de repos permet d'éliminer les oeufs qui, malgré les précautions prises, développent une réaction inflammatoire ou ont été contaminés.

#### 2.1.1.1.2. Technique de préparation in vitro

Cette technique est moins utilisée que la précédente, mais présente certains avantages.

Après trois jours d'incubation, la coquille est cassée et l'on recueille l'oeuf dans une boîte de petri contenant un milieu de culture complet. L'ensemble est disposé dans une autre boîte de dimension supérieure qui contient suffisamment d'eau pour maintenir un taux d'humidité relative proche de 60%. Le tout est protégé par un couvercle disposé de telle sorte qu'il puisse permettre les échanges gazeux avec le milieu extérieur (Auerbach et al. 1974). Un schéma de ce dispositif est présenté dans la figure 4.

Dunn (Dunn et al. 1981) propose une technique plus sophistiquée qui consiste à déposer l'oeuf sans coquille sur une membrane soutenue par un tripode, le tout pouvant être posé au dessus d'une chambre d'humidification comme cela est schématisé sur la figure 5 (Vu et al. 1985).

Ces techniques de culture d'embryon in vitro présentent a



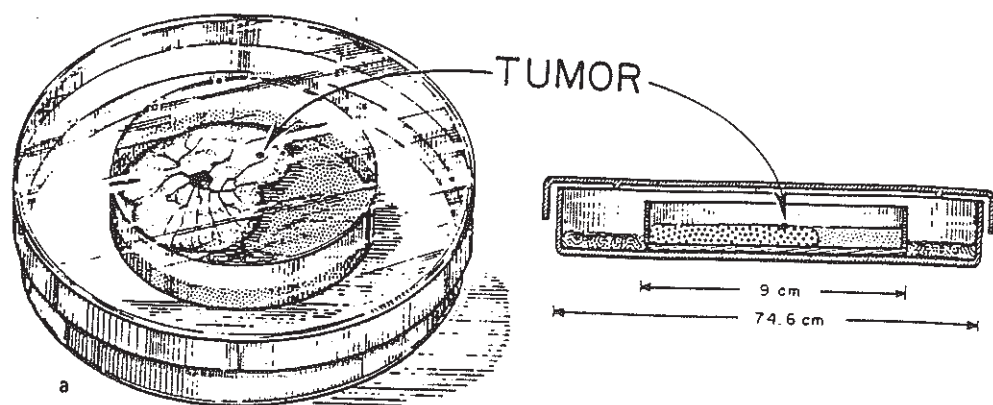


FIGURE 4 - Culture d'embryon in vitro (d'après Auerbach 1974)

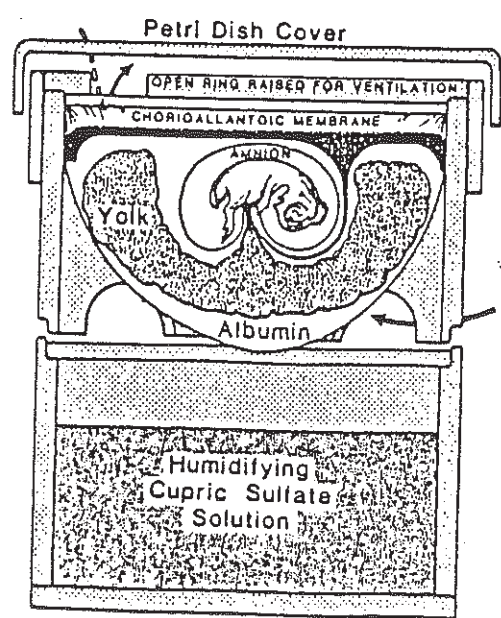


FIGURE 5 - Culture d'embryon in vitro (d'après Vu et al 1985)

priori un certain nombre d'avantages :

- Elles évitent la manipulation longue et délicate de découpe d'une fenêtre dans la coquille.
- Elles permettent un accès facile à toute la surface de la membrane chorioallantoïque autorisant plusieurs dépôts sur le même embryon et facilitant les observations (Vu et al. 1985).
- Elles permettent de diminuer l'encombrement des embryons dans l'incubateur lorsqu'on utilise la technique en boîte de Pétri (Auerbach et al. 1974).

Malgré tout, ces méthodes de préparation sont peu employées sans doute à cause des inconvénients qu'elles présentent :

- La mortalité des embryons est plus élevée, surtout en boîte de Pétri (Auerbach et al. 1974).
- Elles nécessitent des modifications de la composition en gaz de l'air alimentant l'incubateur (Vu et al. 1985).

#### 2.1.1.2. Préparation et dépôt de l'échantillon

Pour que l'on puisse apprécier leur effet angiogénique, les échantillons à tester doivent être déposés sur une surface faible (1 à 2 mm<sup>2</sup>) et sous une forme solide qui peut être un fragment de tissu ou un extrait incorporé dans une matrice.

Le choix de la matrice revêt un caractère primordial car celle-ci ne doit pas entraîner de réactions inflammatoires au contact de la membrane chorioallantoïque et doit permettre la

diffusion lente et régulière du produit dont on veut tester les propriétés angiogéniques.

Le tableau IV ci après résume et commente les différents types de dépôts qui ont été proposés dans la littérature.

Parmi tous les types de dépôts proposés, le Termanox<sup>(R)</sup>, l'Eluax<sup>(R)</sup> et la méthylcellulose sont les trois supports les plus souvent cités ou qui ont suscité le moins de critiques sur des critères de facilité de manipulation et de fréquence de réactions inflammatoires.

Le dépôt est effectué sur des embryons âgés de dix ou onze jours. Cette période a été montrée comme optimale par Knighton (Knighton et al. 1977). Elle correspond à un stade de développement suffisant pour que le réseau vasculaire de l'embryon soit sensible à un effecteur angiogénique externe, mais où le volume encore réduit de l'embryon permet une observation facile des effets angiogéniques.

Le dépôt se fait en un point de la membrane chorioallantoïque suffisamment éloigné de l'embryon, et dans une région si possible avasculaire.

#### 2.1.1.3. Mesure de l'effet angiogénique

La mesure de l'effet angiogénique peut commencer 24 heures après le dépôt et se poursuivre pendant deux à trois jours par périodes de 24 heures (Knighton et al. 1977). Il n'existe pas de norme ou de constante qui permettent de mesurer exactement -

TYPE DE DEPOTS	OBSERVATIONS
<p>Sans matrice</p> <p>Lyophilisat (Phillips 1979, Shahabuddins 1985, Arnold 1987).</p> <p>Anneau en plastique (Dusseau 1988) ou en verre (Stockley 1980).</p>	<p>Pas de réactions inflammatoires parasites. Suppose une faible activité spécifique. Difficile à manipuler.</p> <p>Permet de tester les composés en solution. Peut s'enfoncer dans la membrane et créer une réaction inflammatoire. Délicat à manipuler sans blesser la membrane.</p>
<p><u>Adsorption par support</u></p> <p>Filtre en fibre de verre de type Whatman<sup>(R)</sup> (Klagsbrun 1976, Ohtsu 1988, Okamoto 1988) ou filtre en acétate de cellulose de type Millipore<sup>(R)</sup> (Mostaffa 1980, Barnhill 1983) saturé avec une solution de produit à tester.</p>	<p>Facile à préparer et à manipuler. Risques de réactions inflammatoires surtout avec les filtres en fibre de verre. Libération du produit aléatoire. Difficulté pour mesurer la quantité de produit adsorbé sur le filtre.</p>

TABLEAU IV - Types de dépôts sur membrane chorioallantoïque d'oeuf

TYPE DE DEPOT	OBSERVATIONS
<p>Billes de Sephadex<sup>(R)</sup> saturées avec la solution à tester (Gospodarowicz 1985).</p> <p>Solution à tester séchée sur disque Thermanox<sup>(R)</sup> (Fett 1985, Folkman 1982).</p>	<p>Mêmes remarques que pour les filtres : moins inflammatoires que ceux-ci mais moins faciles à déposer.</p> <p>Permet un dosage précis de la quantité de matériel déposé.</p> <p>Transparent, donc facilite les observations.</p> <p>Peut provoquer des réactions inflammatoires.</p> <p>Ne permet pas la libération contrôlée des produits à tester.</p>
<p style="text-align: center;"><u>Incorporation dans une matrice</u></p> <p>Copolymère d'acétate d'éthylène et de vinyle, Elvax<sup>(R)</sup> (Langer 1976, Fenselan 1981, Reynolds 1987).</p>	<p>Libération du produit étalée dans le temps.</p> <p>Réactions inflammatoires réduites.</p> <p>Nécessité d'une émulsion car l'Eluax<sup>(R)</sup> n'est soluble que dans le dichlorométhane.</p> <p>Difficulté pour contrôler le quantité exacte de produit incorporé.</p>

TABLEAU IV (suite)

TYPE DE DEPOT	OBSERVATIONS
Méthylcellulose à 1% (Folkman 1983, Morris 1988)	Soluble dans l'eau. Incorporation facile. Peu inflammatoire. Très léger, ne blesse pas la membrane.

TABLEAU IV (fin)

l'activité angiogénique d'une substance dans ce test.

Par analogie avec la vascularisation organisée en "rayon de roue", provoquée par un fragment tumoral angiogénique, les techniques de mesure utilisent cette organisation "idéale" comme modèle de référence d'une activité angiogénique. Un exemple d'effet angiogénique en rayon de roue est présenté dans la figure ci-après.

Les techniques de mesure peuvent être classées en trois catégories :

- Les mesures qualitatives qui consistent à apprécier si oui ou non l'échantillon provoque une vascularisation en rayon de roue (Mostafa et al. 1980, Kumar et al. 1983, Wiseman et al. 1988).
- Les mesures semi quantitatives, où les observateurs conviennent d'un score à donner en fonction de l'intensité de l'effet angiogénique en rayon de roue (Vu et al. 1985, Reynolds et al. 1987).

Ces deux méthodes présentent l'avantage de ne pas exiger de matériel d'observation trop sophistiqué puisqu'il suffit de disposer d'une loupe binoculaire.

Par contre, elles sont peu précises, ce qui rend difficile toute évaluation d'un effet dose. Soumises à la subjectivité des observateurs, elles nécessitent une lecture par plusieurs personnes qui ignorent la nature de l'échantillon (méthode en aveugle) et l'utilisation de plusieurs embryons pour une même

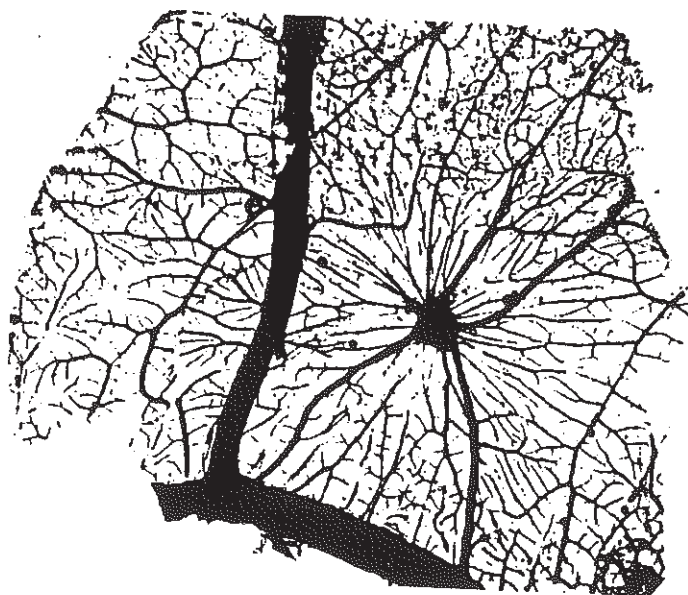


FIGURE 6 - Représentation d'un effet angiogénique en rayon de roue provoqué par le dépôt d'un fragment tumoral sur la membrane chorio-allantoïque d'oeuf embryonné.



dose d'échantillon à tester.

- Des techniques de mesure quantitatives ont été proposées pour diminuer la subjectivité et augmenter la précision de la mesure.

Avec ces méthodes quantitatives, on compte le nombre d'intersections entre les vaisseaux et un certain nombre de cercles qui ont pour centre le point de dépôt de l'effecteur angiogénique (Dusseau et al. 1988).

Ne sont pris en compte que les vaisseaux dirigés vers le centre du dépôt, donc proches de celui-ci (Harris Hooper et al. 1983) ou formant un angle fermé avec les rayons de ces cercles (Barnhill et al. 1983).

Si le dénombrement des intersections est effectué par un observateur, la méthode est plus précise que les techniques précédemment décrites, mais exige un temps d'observation beaucoup plus long. C'est pourquoi Jakob et Woss (1984) ont développé une technique de mesure faisant appel à un analyseur automatique d'image.

#### 2.1.1.4. Interprétation des résultats

L'interprétation doit tenir compte du fait qu'il existe toujours un risque d'inflammation de la membrane chorioallantoïque et qu'il existe des variabilités de réponse pour une même dose d'échantillon à tester.

De plus, l'interprétation doit tenir compte de la techni-

que de mesure.

La distinction entre effet inflammatoire et effet angiogénique est parfois difficile à apprécier, aussi toutes les réactions douteuses devront être éliminées.

La variabilité de réponse peut être compensée en utilisant un nombre suffisant d'oeufs pour chaque dose d'échantillon.

Le protocole expérimental devra prévoir plusieurs dilutions du même échantillon ainsi qu'une série de dépôts témoins de façon à apprécier l'effet dose du produit.

#### 2.1.1.5. Conclusions

Selon nous, la technique de dosage sur membrane chorio-allantoïque d'oeuf peut être utilisée efficacement avec le protocole suivant :

- Préparation des embryons âgés de trois jours in ovo.
- Incorporation des échantillons à tester dans une matrice de méthylcellulose à 1%.
- Dépôt sur les embryons âgés de 11 jours en utilisant au moins dix oeufs par échantillon et par dose.
- Mesure de l'effet angiogénique par la technique semi-quantitative dans les trois jours qui suivent le dépôt.
- Lecture effectuée indépendamment par au moins trois personnes qui ignorent la nature de l'échantillon observé.
- Traitement statistique des résultats par comparaison des moyennes appliquée à un petit nombre d'échantillons.

Dans ces conditions, un produit pourra être déclaré angiogénique si les effets qu'il provoque sont significativement différents du dépôt témoin, s'ils sont reproductibles et dose dépendants.

#### 2.1.2. LE MODELE DE LA CORNEE

La plupart des auteurs s'accordent à dire que le modèle de la membrane chorioallantoïque n'est pas suffisant pour affirmer l'activité angiogénique d'un produit principalement parce que ce test est sujet à de nombreuses réactions inflammatoires parasites (Gullino 1981, Vallee et al. 1985).

Le test de confirmation le plus souvent utilisé est le test d'activité angiogénique effectué sur la cornée (Gimbrone et al. 1974, Langer et Folkman 1976, Kull et al. 1987).

C'est à Gimbrone (Gimbrone et al. 1974) que l'on doit le développement de cette technique. Elle consiste à créer une poche dans la cornée, à y introduire la substance à tester incorporée dans une matrice inerte (cf. figure 6), puis à mesurer la croissance des vaisseaux du limbe cornéen vers le dépôt.

La poche doit être située à 2 mm du limbe pour que les effecteurs puissent diffuser jusqu'au lit vasculaire. Les animaux utilisés sont en général des lapins. Dans une cornée, on introduit le produit à tester, l'autre ne reçoit que la matrice témoin.

La substance à tester doit être incorporée dans un poly-

mère de faible volume (1 mm<sup>3</sup> environ). Les études menées par Langer et Folkman (1976) montrent que le meilleur véhicule est un copolymère d'acétate d'éthylène et de vinyle (Eluax<sup>(R)</sup>). Il est peu inflammatoire s'il est débarrassé de ses impuretés par un lavage prolongé à l'alcool (Langer et al. 1985) et permet une bonne diffusion du produit.

D'autres types de polymères ont été proposés (Bada et al 1982) mais il semble que l'Eluax soit le produit le plus satisfaisant (Gulino 1981).

L'avantage de ce test est qu'il permet d'effectuer des mesures prolongées (sur deux semaines) et quantitatives de l'activité angiogénique.

La cornée étant un tissu avasculaire et transparent, tout vaisseau s'y développant est facilement visible à l'ophtalmoscope et peut être associé à l'activité angiogénique du produit implanté. En outre, étant donné la structure en feuillet de la cornée, la vascularisation ne peut avoir lieu que dans un système à deux dimensions, ce qui permet de corréler la vitesse de croissance des vaisseaux à l'activité angiogénique.

Il est évident que ce test est lourd, tant du point de vue technique que du nombre d'animaux nécessaires à chaque expérience. Il ne peut être effectué que dans les laboratoires spécialisés équipés en matériel ophtalmologique. Cependant, il nous semble indispensable d'utiliser cette technique de dosage pour confirmer une activité angiogénique détectée grâce au test de la membrane chorioallantoïque.

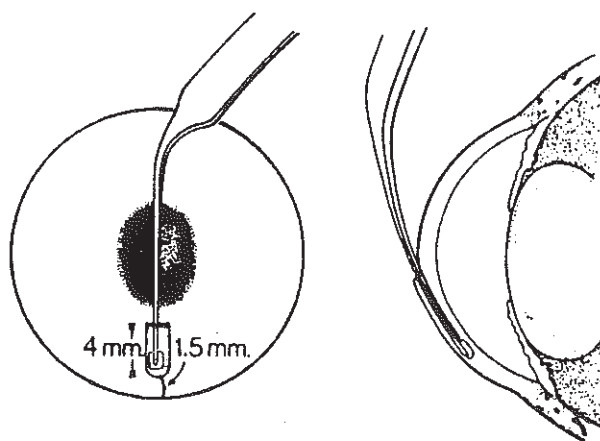


FIGURE 7 - Représentation schématique du  
procédé d'implant cornéen

### 2.1.3. AUTRES TESTS IN VIVO

D'autres techniques d'observation de l'angiogenèse in vivo ont été décrites dans la littérature. Elles sont maintenant largement remplacées par les deux méthodes décrites précédemment.

Parmi ces techniques, nous citerons :

- Le test de l'abajoue de Hamster qui consiste à distendre la membrane de l'abajoue (par injection d'air) afin de la rendre transparente, puis à introduire un transplant angiogénique entre la peau et cette membrane. On observe alors l'évolution de la vascularisation de la membrane (Greenblatt et Shubik 1968).
- Le test de la poche d'air dorsale. Développée par Folkman et al (1971) avant la mise au point du test de la cornée, cette technique consiste à créer une poche dans le tissu sous cutané grâce à l'injection de quelques millilitres d'air. La substance à tester est placée dans un conteneur capable d'assurer sa libération prolongée, et l'on observe la vascularisation de l'aponévrose environnant le dépôt.

Cette méthode présente deux limitations :

- Elle nécessite une opération chirurgicale pour observer la vascularisation de l'aponévrose.
- Elle demande une quantité relativement importante de matériel à tester.

Globalement, ces deux techniques ont l'inconvénient de

requérir à des opérations chirurgicales provoquant des réactions inflammatoires qui perturbent l'observation.

Les techniques de dosage in vivo sont les seules qui permettent de reproduire le phénomène angiogénique dans sa totalité. Elles peuvent se révéler indispensables pour suivre la purification de facteurs dont l'activité angiogénique n'est pas modélisable in vitro.

Elles n'en présentent pas moins certains inconvénients dont le principal est la lourdeur des protocoles expérimentaux. C'est pourquoi il a été développé récemment des techniques in vitro qui font appel à la culture cellulaire.

## 2.2. LES TECHNIQUES IN VITRO

\*\*\*\*\*

L'observation attentive des étapes de l'angiogenèse montre que l'acteur principal de ce phénomène est la cellule endothéliale qui secrète des protéases, migre et se divise.

Bien que pour des raisons de facilité, de nombreuses études effectuées in vitro fassent appel à des cellules endothéliales de veine et d'aorte (Shepro et D'Amore 1984), il est nécessaire d'utiliser des cellules endothéliales issues de capillaires ou de microvaisseaux, car :

- l'angiogenèse ne se développe qu'à partir de capillaires ou de veinules (Cliff 1963);
- les néovaisseaux ont une structure de capillaire (Wagner 1980);

- il existe des différences de comportement vis à vis des facteurs angiogéniques entre les cellules endothéliales issues de capillaires ou de gros vaisseaux (Vallée et al. 1985).

La culture des cellules endothéliales capillaires est une technique délicate dont nous décrivons ci-dessous les principales étapes.

#### 2.2.1. ISOLEMENT DES CELLULES ENDOTHELIALES CAPILLAIRES

Il n'existe pas de lignées établies de cellules endothéliales capillaires. Les cellules sont en général extraites de la glande surrénale ou de tissus adipeux (cf. tableau V), avec un rendement faible et une contamination fréquente par les cellules fibroblastiques.

Les techniques d'isolement combinent en général un traitement à base de collagénase, pour détacher les cellules de la membrane basale, et des opérations de filtration et de centrifugation pour éliminer les cellules contaminantes (Shepro et D'Amore 1984). Ces opérations peuvent être suivies d'un clonage qui permet d'éliminer totalement les cellules contaminantes (Folkman et al. 1979).

#### 2.2.2. MAINTIEN DES CELLULES EN CULTURE

La mise au point du milieu de culture pour cellules endothéliales capillaires est une étape délicate.

Les premières cultures de cellules capillaires ont pu être



maintenues pendant plus de huit mois, uniquement en présence d'un substrat de gélatine et dans un milieu de culture riche en sérum conditionné par un sarcome murin (Folkman et al. 1979).

En fait, il semble que la composition du milieu nécessaire à la survie des cellules dépend de leur origine d'espèce et d'organe (Zetter et al 1981).

Le tableau V ci-après, qui résume les conditions de culture décrites dans la littérature, montre bien l'hétérogénéité et la complexité des milieux utilisés. Il est en fait pratiquement impossible de comparer précisément les travaux effectués dans les différents laboratoires travaillant dans le domaine de l'angiogenèse. Des efforts ont été faits pour simplifier la composition des milieux. La caractérisation du Fibroblast Growth Factor (F.G.F.) et la mise en évidence de ses propriétés mitotiques pour les cellules endothéliales, a permis de le substituer aux milieux conditionnés. Certains types de cellules endothéliales ne nécessitent pas la présence de FGF (Kern et al. 1983). Cependant, la présence de 10 à 20% de sérum est toujours indispensable.

### 2.2.3. HETEROGENEITE RELATIVE DES CELLULES CAPILLAIRES

Bien que les cellules capillaires présentent les mêmes caractéristiques morphologiques in vitro, suivant leur origine d'espèce ou d'organe, les besoins nutritionnels peuvent être très éloignés. Ainsi, il est plus facile de cultiver des cellules capillaires bovines que des cellules humaines (Folkman et al. 1979).

ORIGINE	CONDITIONS DE CULTURE	REFERENCES
Surrénales	DMEM + 10% de FCS dilué au 1/2 dans un milieu conditionné par un sarcome (DMEM + 10% FCS deux jours en présence de sarcome 180), culture sur gélatine ou collagène.	Folkman et al. 1979 Moscatelli et al 1986
Surrénales bovines	45% de milieu de Eagle modifié + 45% de milieu conditionné par sarcome 180+10% de sérum de veau + 2,5 µg/ml de supplément de croissance pour cellules endothéliales.	Mullins et Rifkin 1984
Surrénales bovines	DMEM + 10% de FCS + 5 µl/ml d'extrait rétinien.	Rissau et Lemmon 1988 Morris et al. 1988
Surrénales	MEM + 15% de sérum de veau inactivé par la chaleur culture surgélatine.	Montesano et Ora 1985
Cerveau bovin	RPMI 1640 + 4 mM glutamine + 20% de FCS	Goetz et al. 1985

TABLEAU V - Origine et conditions de culture des cellules endothéliales capillaires

ORIGINE	CONDITIONS DE CULTURE	REFERENCES
Poumon de souris LE II	?	Friesel et Maciag 1988
Cerveau de souris	MEM + 10% de FCS + 1% acides aminés + 1% vitamine.	Dropulic et Masters 1987
Microvaisseaux du coussinet de l'é- dydime de rat	Milieu 199 + 20% de FCS inactivé à la chaleur en coculture avec des myofibroblastes.	Sato et al. 1987
Surrénale, rate, ou prépuce humain	Milieu conditionné par sarcome 180 dilué au 1/2 dans un milieu minimal contenant 20% de sérum humain + 250 mg/ml de FGF + 1 µg/ml de thrombine + 50 µg/ml de supplément de croissance pour cellules endothéliales.	Folkman et al. 1979
Capillaires humains	Milieu de Eagle 199 + 15% de FCS + 25 µg/ml de FGF + héparine.	Starksen et al. 1987
Epiploon humain	Milieu de Eagle 199 + 10% de FCS.	Kern et al. 1983

TABLEAU V (fin)

On peut améliorer les conditions de culture des cellules capillaires humaines en ajoutant un certain nombre de facteurs, comme par exemple un milieu conditionné par d'autres cellules humaines endothéliales (Zetter et al 1981).

Pour une espèce donnée, on note aussi une hétérogénéité en fonction du tissu d'où est extraite la lignée cellulaire : les concentrations optimales en héparine varient selon la provenance des cellules endothéliales humaines (Hoshi et Mc Keehan 1986). La culture de ces cellules isolées à partir de tumeurs est améliorée si le milieu est conditionné par la lignée tumorale dont elles sont issues (Alby et Auerbach 1984).

#### 2.2.4. MODIFICATIONS PHENOTYPIQUES DES CELLULES EN CULTURE

La mise au point de milieu permettant le maintien des cellules capillaires pendant plusieurs mois a permis de mettre en évidence des modifications phénotypiques des cellules au cours des repiquages.

Ainsi Goetz (Goetz et al. 1985) montre qu'au fur et à mesure des passages, les capillaires du cerveau perdent leur capacité à exprimer une enzyme spécifique, la  $\gamma$  glutamyltranspeptidase. Goldsmith (Goldsmith et al. 1984) met en évidence une diminution de production de l'enzyme de conversion de l'angiotensine au cours du temps. Les expériences menées par Folkman (Folkman et Haudenschild 1980) montrent que la capacité des cellules endothéliales capillaires à s'organiser en un réseau pseudocapillaire est fonction du nombre de passages.

Les évolutions phénotypiques des cellules capillaires in vitro nécessitent le contrôle de la stabilité des paramètres mesurés avant d'extrapoler ces résultats in vivo. Quoiqu'il en soit, la possibilité d'utiliser les cellules endothéliales in vitro est un progrès qui permet l'étude plus précise des phénomènes cellulaires liés à l'angiogenèse.

Les trois phénomènes le plus souvent étudiés sont la synthèse de protéases, la migration, la prolifération.

#### 2.2.5. PHENOMENES BIOLOGIQUES LIES A L'ANGIOGENESE ET QUANTIFIABLES DANS LES ESSAIS IN VITRO

##### 2.2.5.1. Secrétion de protéases

Il est possible de doser dans le milieu de culture les protéases secrétées après stimulation des cellules endothéliales. Les protéases les plus abondamment secrétées sont la collagénase et l'activateur tissulaire du plasminogène (Moscatelli et Rifkin 1988).

Juste avant la stimulation, les cellules sont généralement maintenues en culture dans un milieu synthétique afin d'éviter l'inhibition de ces enzymes par les protéines sériques.

Après la stimulation qui dure généralement 24 ou 48 heures, les surnageants cellulaires sont recueillis et leur activité enzymatique est mesurée vis à vis de substrats spécifiques (hydrolyse du collagène marqué au C<sup>14</sup> pour la collagénase, test

en "fibrine plate" ou dégradation du substrat synthétique S22-51 pour le dosage de l'activateur tissulaire du plasminogène).

#### 2.2.5.2. Migration des cellules endothéliales

Les expériences de migration peuvent s'effectuer selon divers protocoles.

##### 2.2.5.2.1. La chambre de Boyden

C'est la technique la plus fréquemment utilisée lorsque l'on veut mesurer la mobilité cellulaire.

L'appareil est constitué de deux chambres séparées par un filtre que les cellules en mouvement peuvent traverser. La substance supposée chimiotactique diluée dans le milieu de culture, est introduite dans l'une des chambres et la suspension dans l'autre. Un gradient se constitue au travers du filtre et peut déclencher un mouvement cellulaire vers la chambre contenant le produit à tester.

Les mouvements des cellules à travers le filtre peuvent être de nature chimiocinétique (déplacement aléatoire) ou chimiotactique (déplacement unidirectionnel dans un gradient). Il est donc nécessaire de vérifier quelle est la nature du phénomène observé.

Cette technique offre plusieurs avantages :

- Elle est facile à utiliser.
- Elle permet la quantification.

Par contre, son principal inconvénient tient dans le fait que le gradient s'annule rapidement alors que le mouvement des cellules endothéliales est relativement lent (Zetter 1987).

#### 2.2.5.2.2. Phagocinétisme cellulaire

Cette technique est basée sur les propriétés de migration et de phagocytose des cellules endothéliales. Les cellules sont étalées sur une surface recouverte de fines particules telles que l'or colloïdal ou des microbilles de plastique. Les cellules endothéliales ingèrent ces particules par phagocytose si elles se meuvent, elles laissent derrière elles une trace claire qui révèle la distance et la direction parcourue (Shepro et d'Amore 1984). Cette trace peut être quantifiée par un système d'analyse d'image (Zetter et al. 1981).

Cette technique a permis de mettre en évidence les propriétés inductives d'une migration cellulaire pour un certain nombre de facteurs angiogéniques (Schor et Schor 1983). Contrairement à la chambre de Boyden, ce modèle ne peut mettre en évidence l'effet chimiotactique d'une substance.

#### 2.2.5.2.3. Cicatrisation in vitro

Il s'agit de provoquer une lésion mécanique dans un tapis cellulaire monocouche, confluent, et de compter les cellules qui migrent du bord de la lésion pour combler l'espace laissé vide (Muller et al 1987).

#### 2.2.5.2.4. Migration en gel d'agarose

Cette technique consiste à mesurer l'expansion radiale d'une population cellulaire déposée, avec la substance à tester, dans un puits creusé dans un gel d'agarose (Wall et al. 1978).

Etant donné l'importance de la migration des cellules endothéliales dans le développement de la néovascularisation, ces techniques doivent être utilisées si l'on veut étudier l'angiogénèse et isoler des antagonistes de ce phénomène. Malheureusement ces dosages se prêtent difficilement à la quantification et ne permettent pas d'étudier rapidement un grand nombre d'inhibiteurs potentiels.

#### 2.2.5.3. Prolifération des cellules endothéliales

Le dosage de la prolifération des cellules endothéliales est une technique rapide qui ne pose pas de difficultés particulières à partir du moment où l'on est capable de maintenir les cellules en culture dans un milieu minimum défini qui permet d'étudier l'activité mitogène d'un facteur angiogénique donné.

Deux méthodes sont particulièrement utilisées.

##### 2.2.5.3.1. Mesure de l'incorporation de thymidine marquée

En phase de multiplication, les cellules synthétisent de l'ADN à partir des bases puriques et pyrimidiques. L'adjonction de thymidine marquée (thymidine tritiée) au milieu de



culture permet de mesurer la quantité incorporée dans l'ADN qui est directement proportionnelle au taux de prolifération. On dose, dans un compteur à scintillation, la thymidine marquée après récolte et lyse des cellules.

Cette technique présente l'avantage de ne nécessiter que peu de cellules; elle permet de travailler en plaque de 96 cupules et de traiter un nombre important d'échantillons.

#### 2.2.5.3.2. Comptage cellulaire

Cette technique mesure le nombre exact de cellules qui, après trypsinisation, sont dénombrées dans un compteur de particules. Elle exige une quantité de cellules importantes et ne distingue pas les cellules vivantes des mortes.

Toutes ces techniques de dosage in vivo ou in vitro ont surtout été utilisées pour l'étude d'effecteurs angiogéniques. Elles sont directement applicables à la recherche d'inhibiteurs. Pour les techniques in vitro, il suffit de rajouter l'inhibiteur à l'effecteur dans le milieu de culture. Dans les techniques in vivo, on peut mélanger inhibiteur et activateur dans la même matrice, ou placer de façon contiguë un dépôt contenant l'activateur et un dépôt contenant l'inhibiteur.

La recherche rationnelle d'un inhibiteur ne peut être effectuée qu'après avoir identifié et compris les relations qui lient les effecteurs impliqués au cours du processus angiogénique.

3. LES EFFECTEURS ANGIOGENIQUES

3.1. LES EFFECTEURS CELLULAIRES

\*\*\*\*\*

Certaines cellules sont capables de sécréter des facteurs angiogéniques dont certains ne sont pas encore caractérisés.

3.1.1. LES CELLULES NON TRANSFORMEES POUVANT ETRE IMPLIQUEES  
DANS L'ANGIOGENESE TUMORALE

Un certain nombre de cellules, dont beaucoup sont d'origine immunitaire, peuvent provoquer un stimulus angiogénique. Leur présence dans l'environnement tumoral n'est pas toujours quantitativement importante mais leur activité spécifique est suffisante pour qu'un petit nombre de cellules déclenchent un processus de néovascularisation.

Dans ce chapitre, nous décrirons les cellules qui peuvent jouer un rôle dans l'angiogénèse, cellules immunitaires, plaquettes, cellules endothéliales qui ont toutes la possibilité d'être associées aux tumeurs.

3.1.1.1. Les lymphocytes

L'activité angiogénique des lymphocytes a surtout été décrite lors de réactions immunologiques inflammatoires de type réaction du greffon contre l'hôte. Il semble que les cellules lymphocytaires ne

soient pas particulièrement abondantes autour de la tumeur (Folkman et Cotrant 1976). Cependant il n'est pas exclu qu'elles puissent participer aux phénomènes d'angiogenèse tumorale.

Sydky et Auerbach (1975) ont montré que des lymphocytes rendus immunocompétents et injectés in vivo provoquent une angiogenèse dont l'intensité est proportionnelle au nombre de cellules injectées. Cette observation a été confirmée par d'autres équipes (Folkman 1982). Luty (Luty et al. 1983) a montré que ce sont les facteurs sécrétés par les lymphocytes qui provoquent l'angiogenèse. In vitro, un surnageant de culture lymphocytaire induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Watt et al. 1983).

Il a été possible d'isoler l'activité prolifératrice de ce surnageant (Watt et Auerbach 1986). Cette activité spécifique vis à vis des cellules endothéliales capillaires serait due à une ou plusieurs protéines de poids moléculaire supérieur à 12.000 Daltons, sensibles à la pronase, acidorésistantes, thermolabiles, sans affinité pour l'héparine (donc sans rapport avec la famille des FGF) et ne possédant pas les caractéristiques des interleukines 1, 2 ou 3.

En outre, le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) a été récemment isolé à partir de surnageants de culture de lymphocytes  $\tau$  activés (Roberts et al 1986).

Ces expériences montrent que les lymphocytes activés peuvent sécréter des facteurs angiogéniques directs ou indirects

tel le TGF  $\beta$  qui agit par l'intermédiaire des macrophages qu'il active (Gullino 1981), Auerbach 1981).

### 3.1.1.2. Les macrophages

Les macrophages sont constamment associés aux tumeurs et jouent un rôle dans le contrôle de la prolifération tumorale (Montovani et al 1986). Il a été clairement démontré que seuls les macrophages activés in vivo ou in vitro provoquent l'angiogenèse dans le modèle de la cornée de lapin (Polverini et al. 1977).

Les macrophages activés secrètent des facteurs angiogéniques sans qu'il y ait systématiquement de réactions inflammatoires associées (Gullino 1981).

L'activité angiogénique des macrophages est fortement potentialisée par l'hypoxie et l'élévation de la concentration en lactate (Jensen et al. 1986). Cette potentialisation est réversible si la pression partielle en oxygène est augmentée (Knighton et al 1983). Ceci suggère que la  $pO_2$  tissulaire régule l'activité angiogénique des macrophages in vivo.

De nombreux facteurs angiogéniques, dont certains sont caractérisés, peuvent être libérés par les macrophages.

Le Fibroblast Growth Factor (FGF) (Joseph-Silverstein et al. 1988), le Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) (Leibovich et al. 1987) et le Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) (Assoian et al. 1987), synthétisés par les macrophages activés sont directement impliqués dans les phénomènes d'angiogenèse. Le TGF  $\beta$ , en partie

par un mécanisme autocrine, peut induire la synthèse de FGF et de TNF  $\alpha$  (Wisseman et al. 1988, Wahl et al. 1987).

Il n'est actuellement pas prouvé que l'activité angiogénique régulée par les conditions d'hypoxie, étudiée par Jensen (Jensen et al. 1986) et Knighton (Knighton et al. 1983) soit médiée par les facteurs précédemment cités. En effet, cette activité angiogénique observée in vivo se limite in vitro à la sécrétion de l'activateur du plasminogène sans effet mitogénique sur les cellules endothéliales ou fibroblastiques (Knighton et al. 1987).

Un autre facteur angiogénique, appelé angiotropine, sécrété par les macrophages, est en voie de caractérisation par l'équipe de Hockel (Wissler et al. 1986).

L'angiotropine est un polyribonucléopeptide riche en ions cuivriques dont l'activité angiogénique in vivo se traduit par un effet chimiotactique puissant et spécifique des cellules endothéliales et par l'absence d'effets mitogènes sur ces cellules. Le mécanisme de régulation de l'angiotropine est, pour l'instant, inconnu.

Les macrophages jouent donc un rôle important dans l'angiogénèse; ils sont capables de sécréter au moins quatre des plus puissants médiateurs de la néovascularisation : FGF, TNF  $\alpha$ , TGF  $\beta$ , angiotropine. Le fait que certaines de ces activités angiogéniques soient régulées par la  $pO_2$  tissulaire permet de penser que l'hypoxie chronique provoquée par la croissance tumorale est en grande partie responsable du déclenchement et du maintien de la néovascularisation.

Un phénomène identique se produirait au cours de la cicatrisation limitée à la revascularisation des tissus lésés.

### 3.1.1.3. Les plaquettes

Les plaquettes sont en étroite relation avec les cellules endothéliales et peuvent jouer un rôle important dans la néovascularisation. On sait qu'elles sont riches en facteurs mitogènes capables de modifier profondément l'environnement vasculaire tel le "Platelet Derived Growth Factor" ou PDGF).

Plusieurs auteurs ont pu démontrer la participation des plaquettes aux mécanismes d'angiogénèses.

Wall (Wall et al. 1978) met en évidence un facteur plaquettaire non dialysable, thermostable, qui stimule la migration des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses.

On sait que les plaquettes sont très riches en TGF  $\beta$  qu'elles libèrent lors de leur dégranulation (Assoian et Sporn 1986), le TGF  $\beta$  pouvant avoir une activité angiogénique directe ou indirecte via l'activation des macrophages.

Très récemment, l'équipe de Helden (Ishikawa et al. 1989) a caractérisé un facteur angiogénique issue de plaquettes et appelé Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor (PD ECGF) dont l'activité mitotique et chimiotactique est spécifique des cellules endothéliales.

Ces découvertes récentes donnent aux plaquettes une importance accrue dans le contrôle de l'angiogénèse. Ceci n'est pas

surprenant étant donné le rôle essentiel des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire.

#### 3.1.1.4. Les cellules mastocytaires

Les cellules mastocytaires ou mastocytes sont associées aux réactions inflammatoires chroniques et aux tumeurs. Elles contiennent des facteurs qui jouent un rôle important dans l'angiogenèse : l'héparine et certaines protéases (Furcht 1986). In vivo, les mastocytes sont incapables de provoquer l'angiogenèse; par contre, ils sont très rapidement recrutés par un extrait tumoral angiogénique (Kessler et al. 1976). Ainsi les mastocytes joueraient un rôle complémentaire dans le processus angiogénique.

Des observations histologiques ont montré que les mastocytes sont concentrés en aval du bourgeon capillaire en formation.

Parmi les nombreux facteurs synthétisés par les mastocytes, il semble que le plus important soit l'héparine qui est capable de stimuler, dans certaines conditions in vivo, la migration des cellules endothéliales (Azizkhan et al. 1980).

Cette constatation est confirmée par Roche (Roche 1985) qui montre que, au contact des cellules cancéreuses, les mastocytes libèrent de l'héparine qui active la migration des cellules endothéliales.

Bien que les mastocytes soient riches en facteurs potentiellement angiogéniques tels que les protéases, le traitement des lysats mastocytaires à l'héparinase ou à la protamine inhibe

totalelement l'effet angiogénique de ces cellules, ce qui démontre le rôle déterminant de l'héparine (Azizkhan et al. 1980) dans le processus de néovascularisation.

#### 3.1.1.5. Les cellules endothéliales

L'équipe de Gospodarowicz (Schweigerer et al. 1987) a mis récemment en évidence la production de FGF par les cellules endothéliales capillaires et a suggéré le rôle autocrine de ce facteur. Cette observation a été confirmée par Sakaguchi (Sakaguchi et al. 1988) qui a pu bloquer l'activité prolifératrice de cellules endothéliales en culture grâce à un anticorps anti FGF.

On ignore le rôle et la régulation de l'activité autocrine du FGF sur les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse in vivo. Rappelons que les cellules endothéliales secrètent les enzymes protéolytiques qui, dégradant la matrice extra-cellulaire, permettent la constitution des nouveaux vaisseaux.

#### 3.1.2. LE ROLE DES CELLULES TUMORALES DANS L'ANGIOGENESE

En dehors de leur capacité à recruter des cellules productrices de facteurs angiogéniques, les cellules tumorales secrètent des facteurs induisant directement la néovascularisation (Folkman et al. 1971).

La présence d'un facteur angiogénique tumoral ou TAF (Tumor Angiogenesis Factor) a été prouvé dans un grand nombre de lignées cancéreuses : Carcinome Walker 256 (Folkman et al 1971); mélanome



B 16, ménangiome, glioblastome (Folkman et Cotran 1976), adénocarcinome mammaire, hypernéphrome, haémangiome (Phillips et Kumar 1979), chondrosarcome (Stung et al. 1985), adénocarcinome colique (Fett et al. 1985).

Pour des raisons pratiques, la lignée tumorale la plus utilisée pour isoler ce ou ces facteurs angiogéniques a été le carcinome Walker 256.

A partir de cette lignée, plusieurs équipes ont mis en évidence une activité angiogénique due à un facteur non peptidique, de petit poids moléculaire, estimé à 200 Daltons (Schor et al. 1980) ou compris entre 400 et 800 Daltons (Fenselan et al. 1981). Ce facteur a une activité mitogène sur les cellules endothéliales mais pas sur les fibroblastes. En fait, ce ou ces facteurs ne semblent pas être spécifiques des tumeurs (Brown et al. 1980) et ils n'ont pas été caractérisés jusqu'à présent. Peut-être sont-ils identiques aux facteurs isolés par Kull.

Kull (Kull et al. 1987) est le premier à avoir caractérisé un facteur angiogénique de petit poids moléculaire extrait d'un surnageant de culture de carcinome Walker 256. Il isole, par chromatographie, deux fractions ayant une activité angiogénique *in vivo*. La première fraction se révèle être la nicotinamide et la seconde non caractérisée contient de la nicotinamide ou en est dérivée. La nicotinamide est angiogénique, à la dose de 0,2  $\mu$ moles par dépôt dans la cornée de lapin, ce qui ne représente pas une activité spécifique très élevée si on la compare à celle d'autres facteurs angiogéniques de nature polypeptidique tels

que le FGF, le TGF  $\alpha$ , l'angiogénine. Le mécanisme d'action de la nicotinamide est inconnu et il semble peu probable qu'elle ait une activité directe sur les cellules endothéliales (Kull et al. 1987).

Les récents progrès en matière de purification des protéines et la mise au point de techniques de dosage de l'activité angiogénique in vitro ont permis d'isoler et de caractériser de puissants facteurs angiogéniques de nature polypeptidique produit par les tumeurs.

La présence de FGF a été mise en évidence dans les surnageants de culture d'hépatomes (Klagsburn et al. 1986) et de gliomes (Liebermann et al. 1987).

Dans les cellules du sarcome de Kaposi, Delli Boui (Delli Boui et al. 1987) a identifié un RNA messenger transcript d'un oncogène qui code pour un facteur de croissance de la famille des FGF. Les oncogènes hst et int2 codent eux aussi pour des facteurs de croissance appartenant à cette famille (Marx 1987).

Dans la plupart des tumeurs solides, on peut détecter la présence de RNA messenger codant pour le TGF  $\alpha$  (Derynk et al. 1987) et pour le TGF  $\beta$  (Sinkovics 1988).

L'équipe de Vallée (Fett et al. 1985) a isolé, à partir d'un surnageant de culture d'adénocarcinome colique HT 29, l'angiogénine qui est un des plus puissants effecteurs de la néovascularisation in vivo, mais qui s'est révélé ne pas être spécifique des tumeurs (Weiner et al 1987).

Actuellement il est clair qu'il n'existe pas de facteurs angiogéniques spécifiques des tumeurs. Toutes les molécules identifiées et caractérisées sont exprimées à la fois par les cellules normales et par les cellules transformées. La tumeur est capable d'induire sa propre vascularisation grâce aux facteurs directement angiogéniques qu'elle secrète, mais surtout grâce à sa capacité à mobiliser et à activer les cellules potentiellement angiogéniques qui interviennent dans les mécanismes normaux de néovascularisation. L'hypoxie permanente entraînée par la croissance et les exigences métaboliques des tumeurs entretiendrait constamment ce mécanisme.

L'angiogénèse étant physiologiquement exceptionnelle, il est raisonnable de penser que la conception d'un inhibiteur, spécifique de cette activité, puisse aboutir à un traitement antitumoral original qui compléterait l'arsenal thérapeutique actuel.

Dans la seconde partie de ce chapitre, nous faisons le point sur les découvertes récentes relatives à la biologie moléculaire de l'angiogénèse.

### 3.2. LES EFFECTEURS MOLECULAIRES

\*\*\*\*\*

#### 3.2.1. LA MEMBRANE BASALE ET LA MATRICE EXTRACELLULAIRE

En dehors de leur rôle de soutien, les molécules de la membrane basale et de la matrice extracellulaire jouent une fonction essentielle (mais encore mal comprise) dans les phénomènes

de prolifération et de différenciation cellulaire liés à l'angiogénèse.

Des observations in vivo montrent que la composition biochimique de la matrice extracellulaire varie en fonction de l'état de différenciation des cellules endothéliales au cours de la néovascularisation (Risau et Lemmon 1988).

Ainsi Ausprunk (Ausprunk 1986) a pu montrer, sur les coupes de membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné, que l'expression de l'acide hyaluronique et des glycosaminoglycanes sulfatés dépend du degré de maturation des capillaires : du 4ème au 14ème jour d'embryogenèse, il observe un déplacement graduel d'une haute concentration en acide hyaluronique vers une haute concentration en glycosaminoglycanes associés aux veinules et artérioles se développant dans la région mésodermale.

L'acide hyaluronique pourrait jouer un rôle essentiel dans le contrôle de l'angiogénèse comme l'a montré Feinberg (Feinberg et Beebe 1983). Il semble que ce soit le degré de polymérisation de l'acide hyaluronique qui module la vascularisation.

Kumar (Kumar et West 1986) montre que si l'acide hyaluronique de haut poids moléculaire est inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales in vitro, les fragments de petits poids moléculaires ont un effet positif sur la multiplication et la migration de ces cellules.

L'importance du collagène dans le développement de l'angiogénèse in vivo est mis en évidence par Maragoudakis (Maragou-

dakis et al 1988) qui montre qu'un inhibiteur de la biosynthèse du collagène inhibe la vascularisation de la membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné.

Les études in vitro confirment ces observations et montrent que le phénotype des cellules endothéliales est modulé selon le type de collagène. Ainsi les collagènes de type I et III seraient nécessaires à la prolifération et à la migration des cellules (Schor et Schor 1983, Form et al. 1986, Madri et Pratt 1986).

Le collagène de type IV serait associé à la différenciation cellulaire (Kramer et al. 1985) qui conduit à la formation de la lumière capillaire (Form et al 1986), l'organisation de ces cellules en tubules (Schor et Schor 1983) et la biosynthèse de laminine (Madri et Pratt 1986).

La laminine est considérée comme un marqueur de la différenciation des cellules endothéliales et de la maturation des vaisseaux (Risau et Lemmon 1988). Elle serait sécrétée par les cellules endothéliales (Risau et Lemmon 1988).

Ingber (Ingber et al. 1987) a montré que la laminine diminuait très fortement la sensibilité des cellules capillaires aux facteurs de croissance de la famille des FGF.

Pour d'autres auteurs, la laminine serait un marqueur précoce de la différenciation cellulaire (Risau et Lemmon 1988) qui apparaîtrait avant le collagène de type IV (Form et al. 1986).

La fibronectine est une molécule d'adhésion qui joue un

rôle essentiel dans l'angiogenèse. Les études de Mac Auslan (Mac Auslan et al. 1980) et de Boversox (Boversox et Sorgente 1982) suggèrent que la fibronectine induit la migration des cellules endothéliales. Plus récemment, les études effectuées par Risau (Risau et Lemmon 1988) ont mis en évidence la multiplication et la migration des cellules endothéliales associées à la formation d'une matrice riche en fibronectine.

Dans l'angiogenèse tumorale, un gradient de fibronectine, induisant l'haptotactisme (migration induite par un gradient de molécules non solubles) des cellules endothéliales pourrait être secrété par les cellules cancéreuses (Obrenovitch et Monsigny 1986).

D'autres molécules insolubles, induites par le développement tumoral, peuvent intervenir dans la régulation de l'angiogenèse.

La fibrine est un constituant habituel du stroma tumoral. D'après Nagy (Nagy et al 1988), cette protéine a une activité chimocinétique et/ou chimiotactique vis à vis des macrophages et des cellules endothéliales. On sait, d'autre part, que la fibrine est un puissant inducteur de l'activateur tissulaire du plasminogène, enzyme qui joue un rôle essentiel dans la dégradation de la matrice extra cellulaire nécessaire à la croissance des nouveaux vaisseaux.

La Tenascine, une glycoprotéine de la matrice extra cellulaire impliquée dans les interactions mesenchyme/épithélium, secrétée essentiellement par les tumeurs et exprimée au cours de

l'embryogenèse pourrait jouer un rôle dans l'angiogenèse (Bourdon et Ruoslahti, 1989).

Peu d'études permettent d'expliquer clairement le mécanisme de régulation de l'angiogenèse par les composants de la matrice extracellulaire. Ceci s'explique par la difficulté d'obtenir des protéines suffisamment purifiées et caractérisées pour mener à bien ces travaux.

Néanmoins il semblerait que la fibronectine et le collagène de type IV soient associés à la prolifération et/ou à la migration des cellules endothéliales, la laminine et le collagène IV à la maturation et à la différenciation, fibrine et tenascine dans certains états pathologiques tels que la cancérisation.

### 3.2.2. PROTEASES ET AUTRES ENZYMES ASSOCIEES A L'ANGIOGENESE

Tous les intervenants cellulaires impliqués dans l'angiogenèse ont la capacité de sécréter des enzymes qui contribuent à la dégradation de la matrice extracellulaire et à l'activation de l'angiogenèse.

#### 3.2.2.1. Protéases secrétées par les cellules endothéliales

Comme nous l'avons montré précédemment, une des étapes clefs de l'angiogenèse est la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire qui est nécessaire à la migration ultérieure des cellules endothéliales.

In vitro, les cellules endothéliales sont capables de secré-

ter principalement de la collagénase (Kabelic et al. 1983), l'activateur de plasménogène (Gross et al. 1983) et la stromélysine (Herron et al. 1986).

Les cellules endothéliales secrètent, sous forme de proenzymes, plusieurs types de collagénases : la collagénase interstielle qui dégrade le collagène de types I et III (Herron et al. 1986) et la collagénase spécifique du collagène IV qui compose la membrane basale (Kabelic et al. 1983).

On connaît deux formes biochimiques d'activateurs du plasminogène : le type tissulaire ou TPA, et l'urokinase.

Le type tissulaire activé par la fibrine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'hémostase. La présence fréquente de fibrine au voisinage de la tumeur provoque également une accumulation et une activation du TPA circulant qui favorise la néovascularisation.

L'urokinase n'est pas activé par la fibrine. Si le type tissulaire est secrété par tous les types de cellules endothéliales, l'urokinase semble plus spécifique des cellules endothéliales capillaires (Moscatelli et al. 1988).

Les activateurs du plasminogène transforment le plasminogène en plasmine qui est responsable de la dégradation de la fibrine et, dans certaines conditions pathologiques, de la fibronectine, de la laminine, des glycoprotéines et des protéoglycanes. Si la plasmine ne peut, par elle-même, dégrader tous les constituants de la matrice extracellulaire, elle est capable d'activer



d'autres protéases telles que la collagénase.

La stromélysine, une autre enzyme protéolytique, est sécrétée par les cellules endothéliales in vitro. Comme la collagénase, la stromélysine a un large spectre d'activité protéolytique; elle dégrade aussi le collagène de type IV et active la collagénase.

In vitro, ces protéases ne sont sécrétées de manière significative que si les cellules endothéliales sont activées par les esters du phorbol (Herron et al. 1986) ou par des facteurs angiogéniques tels que les FGF (Rifkin et al. 1987). Ces enzymes sont sécrétées en présence de leurs inhibiteurs endogènes : le TIMP (Tissus Inhibitor of Metalloproteinase) est associé à la collagénase et à la stromélysine (Banda et al. 1987) et le PAI 1 (Plasminogène Activator Inhibitor 1) est associé aux deux types d'activateurs du plasminogène (Van Mourik et al. 1984).

Il existe donc un second niveau de régulation de l'expression protéolytique qui n'est que partiellement élucidé.

Certains facteurs non enzymatiques impliqués dans l'angiogenèse modulent l'activité de ces protéases. Ainsi le TGF  $\beta$  diminue la synthèse de l'activateur tissulaire du plasminogène (Rifkin et al. 1987) et de la collagénase (Moscatelli et Rifkin 1988) et, comme le TNF (Moscatelli et Rifkin 1988), augmente la synthèse d'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (Rifkin et al. 1987).

#### 3.2.2.2. Protéases et autres enzymes sécrétées par les cellules non endothéliales associées à l'angiogenèse

Le même type de protéase peut être secrété par les macrophages et les cellules tumorales (Goldfarb et Liotta 1986).

Ces cellules, avec les plaquettes, peuvent jouer un autre rôle grâce à la sécrétion d'endoglycosidases et d'exoglycosidases (Nakojima et al. 1988), Bernacki et al. 1985) qui facilitent la dégradation des protéoglycanes de la matrice extra cellulaire.

Les hyaluronidases sécrétées par les cellules tumorales peuvent dégrader l'acide hyaluronique en fragments de faible poids moléculaire possédant une activité angiogénique (West et al. 1985). Les cellules tumorales, les macrophages activés, les plaquettes et les lymphocytes T peuvent sécréter des héparanases et des héparitinases qui libèrent et activent le FGF latent fixé aux héparanes sulfates de la membrane basale (Vlodawski et al. 1988).

### 3.2.3. LES FIBROBLAST GROWTH FACTORS

Les Fibroblast Growth Factors (FGF) sont de puissants inducteurs de l'angiogénèse et possèdent une activité mitogène sur un grand nombre de cellules. Ils sont stockés dans la membrane basale et la matrice extra cellulaire de tous les tissus grâce à leur forte affinité pour les héparanes sulfates. Ils sont particulièrement abondants dans les tissus richement vascularisés.

On distingue deux classes de FGF en fonction de leur point isoélectrique et de leur affinité pour l'héparine (Lobb et al. 1986) : la classe des FGF acides qui ont un pHi de 5 à 7, et une affinité moyenne pour l'héparine (Elution à 1 M NaCl) et la classe des FGF basiques, dont le pHi est compris entre 8 et 10, et

qui ont une forte affinité pour l'héparine (Elution à 1,5 M et plus).

Les FGF acides, dont le poids moléculaire est compris entre 14000 et 18000 (Folkman et Klagsbron 1987) ont essentiellement été isolés à partir de tissus nerveux (Thomas 1987), mais on a récemment mis en évidence du FGF acide dans les tissus reinaux bovins (Gantshi-Sauva et al. 1987).

Les FGF basiques, dont le poids moléculaire est compris 16000 et 18000 Daltons (Schweigerer 1988), ont une distribution tissulaire beaucoup plus ubiquitaire, comme le montre le tableau VI ci-après.

La structure des gènes codant pour les FGF acides ou basiques est la même. Il n'existe qu'une seule copie des gènes des FGF acides ou basiques respectivement situés sur les chromosomes 5 et 4 (Mergia et al. 1986).

D'après la séquence nucléotidique, les deux gènes codent pour des peptides de 154 acides aminés possédant entre eux 55% d'homologie stricte (Fiddes et al. 1987).

Si l'analyse de la séquence en aminoacide de la plupart des FGF purifiés est en accord avec la séquencedéduite du génome (Folkman et Klagsbron 1987), il a été récemment montré que les FGF basiques peuvent exister sous forme de peptides de poids moléculaire supérieur (Presta et al. 1988).

Il semble que l'hétérogénéité en poids moléculaire des FGF acides ou basiques, variable selon l'origine tissulaire, soit le

TISSUS NORMAUX OU TRANSFORMES	CELLULES NORMALES EN CULTURE	CELLULES TUMORALES EN CULTURE
Cerveau	Cellules endothéliales de la cornée	Cellules corticosurrénales Y-1
Rétine	Cellules endothéliales capillaires	Ostéosarcome U2OS
Glande pituitaire	Cellules folliculaires pituitaires	Sarcome d'Ewing
Rein	Cellules granuleuses ovariennes	Rhabdomyosarcome
Placenta	Cellules corticosurrénales	Mélanome
Corps jaune	Cellules épithéliales du cristallin	Hépatome (Sk HP-1)
Glande surrénale	Cellules épithéliales de l'utérus	Rétinoblastome
Système immunitaire (macrophages - manocyte)	Myoblastes	
Prostate	Cellules épithéliales du pigment rétinien	
Os		
Cartilage		
Chondrosarcome		
Mélanome		

TABLEAU VI - Distribution tissulaire du FGF basique (d'après Gospodarowicz et al. 1987)

résultat d'un clivage protéolytique de l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale (Moscatelli et al. 1988). On ne connaît pas actuellement la signification physiologique de cette hétérogénéité.

Les FGF acides et basiques ont le même spectre d'activité comme le montre le tableau VII ci-après; ils sont mitogènes pour un grand nombre de cellules, induisant pour certaines leur différenciation, et sont angiogéniques in vivo. En l'absence d'héparine, le FGF acide est 50 à 100 fois moins actif que le FGF basique (Gospodarowicz et Cheng 1986).

C'est essentiellement parce que le FGF basique est présent dans tous les tissus et en concentration plus importante dans les tissus richement vascularisés, que ses effets angiogéniques ont été particulièrement étudiés.

In vivo, le FGF basique induit la néovascularisation dans le modèle de la membrane chorioallantoïque à la dose de 5 ng / dépôt (Moscatelli et al. 1986) et sur la cornée de lapin, à la concentration habituellement plus élevée de 10 ng / dépôt (Squires et al. 1988).

In vitro, le FGF basique induit trois des principaux mécanismes intervenant dans le processus angiogénique. Il est mitogène pour les cellules capillaires endothéliales à des concentrations de 140 à 180 pg/ml (Gospodarowicz et al. 1987). Il induit la migration et la sécrétion de protéases chez ces mêmes cellules à des concentrations identiques (Moscatelli et al. 1986).

Dans une matrice tridimensionnelle de collagène, le FGF induit l'organisation des cellules endothéliales en réseau caracté-

CELLULES NORMALES	FGF basique	FGF acide
Cellules gliales et astrogliales	+ (D)	+
Oligodendrocytes	+ (D)	+
Cellules de Schwann	+	?
Cellules des structures trabéculaires	+	?
Cellules endothéliales des capillaires des gros vaisseaux et de l'endocarde	+ (D)	+ (D)
Cellules endothéliales cornéennes	+ (D)	+ (D)
Fibroblastes	+	+
Myoblastes	+ (D)	+ (D)
Muscles lisses vasculaires	+	+
Chondrocytes	+ (D)	+ (D)
Ostéoblastes	+	+
Cellules du blastoderme	+	+
Cellules corticosurréaliennes	+	+
Cellules de Sertoli	+	+
Cellules myéloïdes	+	+
Cellules mésothéliales	+	+
Cellules neuronales	+	?
LIGNEES CELLULAIRES ETABLIES		
Fibroblast 1 de rat	+	+
Balb/c 3T3	+	+
Swiss 3T3	+	+
BHK 21	+	+
Rhabdomyosarcome A 204	+	?
PC 12	(D)	(D)

TABLEAU VII - Activité pleiotropique des FGF acides et basiques

+ effet prolifératif  
(D) induit la différenciation cellulaire  
? effet prolifératif non déterminé

téristique de tubules capillaires (Montesano et al. 1986).

Il existe entre 1000 et 10000 récepteurs sur les cellules sensibles au FGF (Schweigerer et al. 1987). Les FGF acides ou basiques interagissent avec le même récepteur (Neufeld et Gospodarowicz 1988) et possèdent une affinité de 200 à 30 pM selon le type de cellule étudié (Gospodarowicz et al. 1987).

Bien que la glycosilation de ces récepteurs soit hétérogène en fonction des tissus (Neufeld et Gospodarowicz 1988), celle-ci est indispensable à l'activation cellulaire (Feige et Baird 1988).

On ne connaît pas actuellement le mécanisme intracellulaire de transfert du signal mitogénique du FGF.

Il ne semble pas que l'activation du récepteur soit couplé à celui de la phospholipase C (Magnaldo et al. 1986), et, d'autre part, les résultats concernant la phosphorylation de la tyrosine kinase (voie alterne de l'activation cellulaire) sont contradictoires (Folkman et Glagsbrun 1987).

On a pu mettre en évidence une internalisation et une dégradation lysosomiale des FGF basiques (Moenner et al. 1987) et acides (Friesel et Maciag 1988). Cette internalisation serait suivie d'une accumulation de FGF dans le noyau qui s'accompagnerait d'une augmentation du niveau de transcription de l'ARN ribosomal (Bouche et al. 1987).

Cette observation nécessite confirmation, mais elle pourrait expliquer le mécanisme d'action des FGF puisque les voies

classiques d'activation ne semblent pas impliquées.

Certains auteurs ont mis en évidence, au niveau de la matrice extracellulaire, un autre type de récepteur de plus faible affinité dont le Kd est de l'ordre de  $10^{-9}$  M et qui est sensible à l'action de l'héparinase (Feige et Baird 1988). La liaison à ces sites de faible affinité n'entraîne pas d'effets biologiques (Moscatelli 1987).

Il est probable que ces sites soient un lieu de stockage du FGF sur les héparanes sulfates de la matrice extracellulaire (Vlodovski et al. 1987).

Etant donné l'ubiquité de sa distribution et de ses effets biologiques, l'activité biologique du FGF basique doit être strictement régulée dans l'organisme.

En fait, les FGF ne sont pas détectés dans les liquides biologiques, ils sont toujours associés aux héparanes sulfates de la membrane basale et de la matrice extracellulaire (Vlodovski et al 1987). De plus, la caractérisation des séquences peptidiques et nucléotidiques des RNA messagers codant pour les FGF montrent que ces facteurs ne possèdent pas de séquence signal (Fiddes et al. 1987). Par conséquent, si ces molécules sont sécrétées par la cellule, c'est au travers d'un mécanisme de translocation inhabituel.

Il est possible que les FGF soient sécrétés en association avec les héparanes sulfates de la matrice extracellulaire (Baird et Ling 1987) puis stockés dans cette matrice qui les protège des dégradations protéolytiques (Saksela et al 1988).



Présents dans la matrice extracellulaire, mais inactifs, les FGF peuvent être libérés et activés lors de l'altération de la matrice.

Un autre mode de régulation des effets biologiques des FGF fait intervenir le TGF  $\beta$ .

En effet, in vitro, le TGF  $\beta$  est inhibiteur de la plupart des effets biologiques exercés par les FGF sur les cellules endothéliales (Roberts et Sporn 1987, Saksela et al. 1988). In vivo, cette molécule joue certainement un rôle important, mais encore mal déterminé, dans la régulation de l'angiogenèse induite par les FGF.

Rôle du FGF basique dans l'angiogenèse tumorale : On ne sait pas actuellement quelle est l'importance réelle du FGF basique dans l'angiogenèse tumorale. Néanmoins, nous pouvons émettre un certain nombre d'hypothèses.

La tumeur et les cellules associées peuvent directement ou indirectement augmenter la sécrétion cellulaire de FGF ou libérer les molécules stockées dans la matrice extracellulaire.

Il est peu probable que les tumeurs surexpriment du FGF par un mécanisme d'amplification génique car le niveau d'expression et la quantité de FGF présent dans les tumeurs n'est pas significativement différent de ce que l'on observe dans les cellules normales (Schweigerer 1988).

Les tumeurs peuvent, par mutations ponctuelles ou épissage alternatif du RNA messenger, être à l'origine de la biosyn-

thèse de FGF dont les propriétés angiogéniques ne sont plus régulées. On a récemment mis en évidence trois oncogènes codant pour des protéines ayant 35 à 55% d'homologie avec les FGF basiques. Ces trois oncogènes int2, hst/KS<sub>3</sub>, et FGF 5, codent pour des peptides angiogéniques qui possèdent une séquence signal permettant leur excrétion (Marx 1987; Thomas 1988).

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les cellules tumorales peuvent induire l'angiogenèse en libérant les FGF stockés dans la matrice, ceci grâce à la sécrétion d'héparanase et d'héparitinases.

Les mastocytes associés aux tumeurs secrètent de l'héparine qui peut facilement déplacer les FGF liés aux héparanes sulfates de la matrice extra cellulaire (Bashkin et al. 1989). Enfin, la mise en évidence du rôle autocrine du FGF basique sur les cellules endothéliales (Sato et Rifkin 1988), suggère qu'une dérégulation de cette boucle autocrine par les cellules tumorales pourrait déclencher le processus de néovascularisation.

#### 3.2.4. LES "TRANSFORMING GROWTH FACTORS" DE TYPE $\beta$

Les TGF  $\beta$  sont des peptides multifonctionnels qui contrôlent la prolifération et la différenciation de plusieurs types cellulaires. Ils régulent aussi l'activité de nombreux facteurs de croissance et interviennent à ce titre dans le processus d'angiogenèse.

Les peptides qui appartiennent à la famille des TGF  $\beta$  sont des homodimères de poids moléculaires proches de 25000 Dal-

tons constitués de deux chaînes polypeptidiques de 112 acides aminés reliées par des ponts dissulfures (Derynck et al 1985). On a identifié quatre formes différentes de TGF  $\beta$  qui présentent entre eux une homologie de 70 à 85% (Rizzino 1988).

Les TGF  $\beta$  sont sécrétés sous forme de précurseurs inactifs dont chaque chaîne est constituée de 354 acides aminés (Derynck et al. 1985) qui correspondent à une extension du côté  $\text{NH}_2$  terminal du peptide actif. Le mode d'activation du TGF  $\beta$  n'est pas clairement établi. In vitro, le TGF  $\beta$  est généralement activé en milieu acide. In vivo, la voie d'activation la plus probable consisterait en une protéolyse du précurseur.

Il a été montré que la plasmine et la cathepsine D peuvent libérer du TGF  $\beta$  actif à partir de sa forme latente (Rizzino 1988). D'autres auteurs ont montré que le niveau d'activation du TGF  $\beta$  est fonction de l'état de glycosylation du précurseur inactif (Miyazono et Heldin 1989).

Le TGF  $\beta$  sont présents dans la plupart des tissus (Thompson et al. 1989) et la majorité des cellules expriment des récepteurs au TGF  $\beta$  (Rizzino 1988).

Notre propos se limitera à l'étude des effets du TGF  $\beta$  au cours de la néovascularisation.

Les TGF  $\beta$  sont sécrétés par de nombreuses cellules impliquées dans l'angiogenèse. Ils sont libérés au cours de la dégranulation des plaquettes (Assoian et Sporn 1986) qui contiennent une des plus fortes concentrations cellulaires en TGF  $\beta$  (Derynck

et al. 1985). Un grand nombre de cellules transformées (Derynck et al. 1985). Un grand nombre de cellules transformées (Derynck et al. 1985) expriment l'ARN messager codant pour les précurseurs des TGF  $\beta$ . Enfin, les macrophages et les lymphocytes T activés secrètent du TGF  $\beta$  (Assoian et al. 1987, Roberts et al. 1986).

Le TGF  $\beta$  est inducteur d'angiogenèse lorsqu'il est injecté à des souriceaux nouveaux nés (Roberts et al. 1983).

Dans les modèles d'angiogenèse in vitro, le TGF  $\beta$  inhibe la prolifération des cellules endothéliales induite par les FGF acides ou basiques (Baird et Durkin 1986). Cette activité inhibitrice très puissante est dose dépendante. La dose efficace 50 est comprise entre 0,5 et 1 ng/ml (Frater-Schroder et al. 1986).

A cette concentration, le TGF  $\beta$  inhibe la migration des cellules endothéliales induite par le FGF basique (Muller et al. 1987), diminue la synthèse d'activateur du plasminogène et augmente la sécrétion d'inhibiteur de cette enzyme (Saksela et al. 1987).

Parallèlement à l'inhibition de la croissance et de la mobilité cellulaire, le TGF  $\beta$  induit la synthèse de fibronectine (Muller et al. 1987).

Les études de Heinmark (Heinmark et al. 1986) montrent que l'inhibition de la migration des cellules endothéliales par le TGF  $\beta$  s'annule progressivement au cours d'un contact prolongé entre cellules et TGF  $\beta$ . Ceci suggère que, in vivo, le TGF  $\beta$

pourrait réguler temporairement certains processus nécessaires à l'organisation harmonieuse de l'angiogenèse.

Plus récemment, l'équipe de Madri (Madri et al 1988) a montré que les effets du TGF  $\beta$  sont aussi modulés par la composition de la matrice extracellulaire et son organisation tridimensionnelle. Cette étude confirme l'activité inhibitrice du TGF  $\beta$  sur des cellules cultivées sur un film de collagène et prouve que cet effet n'est pas exercé si les cellules sont cultivées dans une matrice de collagène.

Dans cette dernière condition, le TGF  $\beta$  induit l'organisation des cellules endothéliales en un réseau semblable aux structures capillaires.

La constatation d'une modulation des activités inhibitrices du TGF  $\beta$  permet d'expliquer les résultats contradictoires obtenus au cours des expériences in vivo et in vitro, et montre qu'il faut toujours être extrêmement prudent lors de la conception et de l'interprétation de modèles d'angiogenèse in vitro.

Le TGF  $\beta$  est un inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T et B (Rizzino 1988), mais ces cellules jouent un rôle jugé mineur dans l'activation directe de l'angiogenèse.

Par contre, le TGF  $\beta$  est chimiotactique pour les macrophages. In vitro, des concentrations de 0,1 à 10 pg/ml de TGF  $\beta$  induisent la migration des macrophages (Wahl et al. 1987) et, à plus forte concentration (10 à 100 pg/ml), l'expression d'une activité angiogénique.

Cette néovascularisation est en partie due à la sécrétion de TNF  $\alpha$  dont le taux de RNA messenger est, dans les conditions précédemment décrites, fortement augmenté (Wiseman et al. 1988).

Le TGF  $\beta$  doit être considéré comme un modulateur plutôt que comme un activateur direct de l'angiogenèse. En inhibant temporairement la prolifération et la migration des cellules endothéliales et active la synthèse des composants de la membrane extracellulaire permettant une organisation non anarchique des tissus. Enfin, par l'intermédiaire des macrophages, le TGF  $\beta$  peut activer certaines étapes de l'angiogenèse. Les mécanismes moléculaires qui régulent ces fonctions sont jusqu'à présent inconnus.

Aucun critère d'activité biologique n'a permis de dissocier les différentes formes moléculaires de TGF  $\beta$  décrites à ce jour (Rizzino 1988). L'étude des effets de chacun de ces facteurs et la caractérisation d'un récepteur commun ou spécifique de chaque sous-classe devrait nous permettre de mieux comprendre le rôle des TGF  $\beta$  dans l'angiogenèse.

### 3.2.5. LES "TRANSFORMING GROWTH FACTOR" DE TYPE

Malgré leur homonymie, les TGF  $\alpha$  sont très différents des TGF  $\beta$ .

Les TGF  $\alpha$  sont des peptides dont le poids moléculaire varie de 5000 à 20000 Daltons. Dans leur forme mature, les TGF  $\alpha$  sont constitués d'une seule chaîne de 50 acides aminés dont six

cystéines qui permettent la constitution de trois ponts disulfures. L'analyse de séquence peptidique montre que les TGF  $\alpha$  possèdent 30% d'homologie avec un autre facteur de croissance : l' "Epidermal Growth Factor" ou EGF (Derynck et al. 1984).

La caractérisation du DNA codant pour les TGF  $\alpha$  a montré que la forme mature est le résultat d'une dégradation protéolytique d'un précurseur de 160 ou 159 acides aminés (Lee et al. 1986). Le précurseur glycosilé associé à la membrane cellulaire est constitué d'une séquence extracellulaire de 100 acides aminés qui inclut l'extrémité NH<sub>2</sub> terminale et la forme mature du TGF  $\alpha$ , d'une séquence hydrophobe transmembranaire et d'une séquence COOH terminale intracytoplasmique (Bringman et al. 1987).

L'hétérogénéité des TGF  $\alpha$  s'explique par une variation des types de clivage protéolytique qui aboutissent à la forme mature des TGF  $\alpha$  (Derynck 1988).

Les TGF  $\alpha$  sont exprimés par de nombreuses tumeurs solides (Derynck et al. 1987). Les tissus embryonnaires et adultes sécrètent du TGF  $\alpha$  (Derynck 1988). Les monophages activés sont susceptibles de sécréter une quantité accrue de TGF  $\alpha$  (Madtes et al. 1988).

Les TGF  $\alpha$  sont des facteurs de croissance qui possèdent le même spectre d'activité que l'EGF, mais dont l'activité spécifique est généralement plus élevée (Derynck 1988).

La forme mature de 50 acides aminés mais aussi la forme précurseur transmembranaire (Wong et al. 1989), reconnaissent

le même récepteur que l'EGF (Massage et al. 1983). De ce fait, on considère que les TGF  $\alpha$  et l'EGF appartiennent à la même famille de facteurs de croissance actifs sur un grand nombre de cellules dont les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses (Burgess 1989).

Rôle du TGF  $\alpha$  dans l'angiogenèse tumorale : In vivo, le TGF  $\alpha$  induit l'angiogenèse dans le modèle de la bajoue de hamster à des doses de 0,3 à 3  $\mu$ g par dépôt. Dans les mêmes conditions expérimentales, l'EGF induit un effet identique à la dose de 3 à 10  $\mu$ g par dépôt (Schreiber et al. 1986).

Dans cette expérience, l'angiogenèse ne semble pas être déclenchée par une réaction de type inflammatoire.

In vitro, le TGF  $\alpha$  et l'EGF ont la même activité mitogénique sur les cellules endothéliales. Les doses efficaces 50 sont respectivement égales à  $0,6 \pm 0,2$  nM et  $0,8 \pm 0,2$  nM (Schreiber et al. 1986).

Les différences d'activité observées in vivo entre EGF et TGF  $\alpha$  sont sans doute dues à une dégradation plus rapide de l'EGF. Comparés à des effecteurs angiogéniques, tel que le FGF, le TGF  $\beta$  ou l'angiogénine, le TGF  $\alpha$  a une activité spécifique sensiblement plus faible in vivo et in vitro.

On connaît mal les mécanismes angiogéniques déclenchés par le TGF  $\alpha$  mais si son activité se limite à son effet mitogène sur les cellules endothéliales, il apparaît comme un facteur angiogénique relativement mineur.



### 3.2.6. L'ANGIOGENINE

L'angiogénine est un polypeptide monomérique de 123 acides aminés dont la structure secondaire est stabilisée par trois ponts disulfures (Strydom et al. 1985). Elle possède une très forte homologie de séquence avec la famille des RNases.

Les calculs de minimisation d'énergie permettent de prédire que les structures tridimensionnelles de la ribonucléase bovine et de l'angiogénine sont superposables (Palmer et al. 1986). Initialement isolée à partir d'un surnageant de culture de cellules HT 29 (Fett et al. 1985), cette protéine a été purifiée plus récemment à partir de sérum humain normal où elle est présente à la concentration de 400 µg/ml (Shapiro et al. 1987).

L'étude du taux d'expression du RNA messenger codant pour cette protéine montre que celle-ci est surtout exprimée dans le foie adulte et qu'il existe une grande variation d'expression entre les tumeurs étudiées (Weiner et al. 1987). Ainsi l'angiogénine n'est pas un facteur spécifique de la néovascularisation tumorale.

L'angiogénine est un des plus puissants inducteurs de l'angiogenèse in vivo, elle provoque une néovascularisation sur la membrane chorioallantoïque d'oeuf à la dose de 5 ng, et dans la cornée à la dose de 15 ng (Fett et al. 1985).

In vitro, elle ne possède pas les propriétés classiquement attribuées aux facteurs angiogéniques (Liotta 1985).

Malgré la très forte homologie qui existe entre l'angio-

génine et les ribonucléases, celle-ci ne dégrade pas les substrats conventionnels des ribonucléases. L'angiogénine ne dégrade que les acides ribonucléiques ribosomiaux 18 S et 28 S (Shapiro et al. 1986). A ce titre, elle est capable d'inhiber la synthèse protéique dans le modèle de lysat de réticulocyte (St Clair et al. 1988).

L'équipe de Vallée a tenté de relier l'activité ribonucléasique de l'angiogénine à son activité angiogénique (Riordan et Vallée 1988) mais cette relation n'est pas prouvée car une augmentation de l'activité ribonucléasique spécifique de l'angiogénine n'est pas toujours accompagnée par un accroissement de l'activité angiogénique (Harper et Vallée 1989).

Récemment, il a été montré que l'angiogénine induisait la production de diacylglycérol dans les cellules endothéliales à des doses comparables à celles qui provoquent l'angiogénèse in vivo. La production de ce second messager n'est pas accompagnée par une augmentation significative de taux d'inositoltriphosphate ni par une libération de calcium (Bicknell et Vallée 1988).

Pour l'instant, on ne comprend pas comment l'angiogénine peut induire une néovascularisation in vivo. Elle semble interagir avec les cellules endothéliales mais la libération de diacylglycerol n'est pas suivie d'une activité cellulaire spécifique de l'angiogénèse. Sans doute intervient-elle sur un mécanisme non modelisé in vitro, ce qui montre la limitation de telles expériences.

Dans le sérum, l'angiogénine se lie à l'inhibiteur pla-

centaire des ribonucléases présent dans le sérum (Feldman et al. 1988), et qui, se liant très fortement à l'angiogénine (Lee et al. 1989), inhibe son activité (Shapiro et Vallée 1987).

### 3.2.7. LE "TUMOR NECROSIF FACTOR" TNF

Le TNF est un polypeptide non glycosilé de 157 acides aminés. Sa structure primaire est fortement conservée chez les mammifères et dans sa forme active, on suppose que les chaînes polypeptidiques s'associent pour former un homotrimère non stabilisé par des ponts disulfures (Jones et al. 1989).

Le TNF est essentiellement sécrété par les macrophages activés (Bentler et Cerami 1986) et joue un rôle clé en tant que médiateur de l'inflammation. Injecté dans la circulation sanguine, le TNF  $\alpha$  entraîne une nécrose tumorale.

Paradoxalement, les études récentes ont montré que le TNF pouvait être un inducteur de l'angiogénèse.

In vivo, le TNF  $\alpha$  induit une néovascularisation à la concentration de 3,5 ng par dépôt dans le modèle de la cornée de lapin, et de 1 ng par dépôt dans le modèle de la membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné (Leibovich et al. 1987). Dans ces conditions, l'angiogénèse n'est pas accompagnée de réactions inflammatoires qui ne sont observées qu'à des doses de l'ordre de 5  $\mu$ g par dépôt (Frater-Schroder et al. 1987).

Il semble donc que l'on puisse décomposer l'activité angiogénique du TNF  $\alpha$  en deux mécanismes. L'un provoqué directe-

ment par le TNF  $\alpha$  sur les cellules endothéliales, et l'autre provoqué par la mobilisation des cellules impliquées dans l'inflammation.

L'activité directe du TNF  $\alpha$  sur les cellules endothéliales a été étudiée par Leibovich qui montre que le TNF  $\alpha$  induit la migration des cellules endothéliales à des concentrations de l'ordre de 5 à 50 ng/ml (Leibovich et al. 1987) et qui sont comparables à celles nécessaires au FGF pour provoquer les mêmes effets.

En outre, les mêmes auteurs montrent que le TNF  $\alpha$  est capable d'induire la formation de structures capillaires lorsque les cellules sont cultivées en présence de collagène.

Cependant, ces résultats obtenus in vitro sont contredits par Sato (Sato et al. 1987) qui obtient un effet inhibiteur de l'angiogenèse in vitro en cultivant les cellules endothéliales en présence de TNF  $\alpha$  et qui relie cette activité aux propriétés nécrotiques attribuées au TNF  $\alpha$ .

S'il est possible que le TNF  $\alpha$  soit un inducteur de la migration des cellules endothéliales, plusieurs auteurs ont mis en évidence l'activité inhibitrice du TNF  $\alpha$  sur la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF (Frater Schroder et al. 1987, Schweigerer et al. 1987).

Cette inhibition réversible n'est pas due à l'activité cytotoxique du TNF et agirait par un mécanisme encore inconnu.

S'il paraît incontestable que le TGF  $\alpha$  sécrété par les

macrophages soit capable d'induire une néovascularisation en tant que médiateur de l'inflammation, son rôle dans l'induction directe de la migration des cellules endothéliales est encore hypothétique. Si cela était le cas, il pourrait, grâce à sa forte activité spécifique, jouer un rôle aussi important que le FGF, le TGF  $\beta$  ou l'angiogénine. En tout état de cause, son activité angiogénique directe se limiterait à l'activation de la migration cellulaire capable d'induire les autres étapes de l'angiogenèse.

### 3.2.8. LE FACTEUR ANGIOGENIQUE DES PLAQUETTES OU PDECGF

Très récemment, l'équipe de Heldin a caractérisé un nouveau facteur angiogénique extrait de plaquettes humaines, qui a été baptisé PDECGF de Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor.

Cette molécule est une protéine de 389 acides aminés, de poids moléculaire 45000 Daltons;; elle n'est pas glycosilée et son point isoélectrique est égal à 4,6. L'analyse de séquences peptidiques montre qu'il n'existe pas d'homologie entre cette protéine et les facteurs angiogéniques déjà caractérisés (Ishikawa et al. 1989). En outre, cette protéine n'a aucune affinité pour l'héparine (Miyagono et al. 1987).

In vivo, ce facteur est angiogénique, dans le modèle de la membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné, à la dose de 50 ng (Ishikawa et al. 1989).

Des cellules tumorales transfectées avec le gène du PDECGF, puis implantées in vivo, sont nettement plus vascularisées que les cellules témoins implantées non transfectées. In vitro, ce facteur est mitogène pour les cellules endothéliales aortiques, mais pas pour les fibroblastes.

L'activité maximum est observée à la concentration de zones/ml; elle n'est pas potentialisée par l'héparine (Myazono et al. 1987).

Le PDECGF induit la migration des cellules endothéliales dans le modèle de la chambre de Boyden, la dose efficace de 50 étant proche de 1 ng/ml. Comme pour l'activité mitogène, le PDECGF n'induit pas la migration des cellules musculaires lisses (Ishikawa et al. 1989).

La spécificité du PDECGF vis à vis des cellules endothéliales et le fait qu'il soit stocké essentiellement dans les plaquettes, suggère que le PDECGF joue un rôle de maintien de l'intégrité des vaisseaux sanguins.

Bien que l'on ne connaisse pas la régulation de sa sécrétion, il est possible que le PDECGF antagonise les effets athérogéniques des autres effecteurs plaquettaires en induisant la réparation de la structure endothéliale des vaisseaux.

### 3.2.9. L'ANGIOTROPINE

L'angiotropine, sécrétée par les macrophages activés, est une structure de poids moléculaire 2600 Daltons, composée

d'un polypeptide, de polynucléosides et d'une molécule de cuivre. La séquence et la structure de ce polyribonucléopeptide sont inconnues. La partie polypeptidique est composée de 38 acides aminés et la partie polynucléotidique de 43 bases.

Il semble que le cuivre ainsi que les parties peptidiques et ribonucléotidiques soient indispensables à l'activité de l'angiotropine (Wissler et al. 1986).

Dans le modèle de la cornée de lapin, l'angiotropine est active à la dose de 200 pg.

In vitro, l'angiotropine n'est pas mitogène pour les cellules endothéliales. Cependant, à la concentration de 40 à 400 pg/ml, elle induit le chimiocinétisme de ces cellules alors qu'elle n'a aucun effet sur les fibroblastes 3T3. En présence d'angiotropine, les cellules endothéliales s'organisent en un réseau semblable aux structures capillaires lorsque celles-ci sont cultivées sur un substrat de gélatine (Hockel et al. 1987).

Bien que l'angiotropine ne soit pas encore caractérisée et qu'elle ait fait l'objet de peu d'études, elle présente l'intérêt d'être un des affecteurs angiogéniques les plus efficaces dans les modèles in vivo.

### 3.2.10. CONCLUSION

Dans le tableau ci-après, nous avons résumé les caractéristiques biologiques des effecteurs angiogéniques précédemment décrits.

	Angiogenèse in vivo	Effet mitogène	Induction de protéases	Induction de migration
FGF basique	CAM : 280 f M Cornée : 560 f M	1.5 pM	Même dose	Même dose
TGF $\beta$	Injection souris 8 à 16 pM	Inhibiteur 60 pM	Inhibiteur même dose	Inhibiteur même dose
TGF $\alpha$	Abajoue de hamster 60 nM	600 pM	N D	N D
Angiogenèse	CAM : 360 f M Cornée : 710 f M	Pas d'activité	Pas d'activité	Pas d'activité
TNF $\alpha$	CAM : 60 f M Cornée : 210 f M	Inhibiteur	N D	A confirmer
PDEC GF	CAM : 1,3 pM	20 pM	N D	2 pM
Angiotropine	Cornée : 77 fM	Pas d'activité	N D	50 pM

TABEAU VIII - Comparaison des effets biologiques in vitro et in vivo des principaux effecteurs angiogéniques



Pour faciliter les comparaisons, nous avons exprimé les concentrations en molarité. En ce qui concerne l'activité in vivo, les valeurs indiquent la concentration molaire de l'effecteur qui induit un effet angiogénique significatif. Pour les dosages in vitro, nous avons noté la dose efficace 50 pour chacune des molécules.

Si nous comparons les effecteurs angiogéniques en fonction de leur activité in vivo, nous obtenons le classement suivant : Angiotropine > TNF $\alpha$  > FGF basique > Angiogenine > PDEC GF > TGF  $\beta$  > TGF  $\alpha$ .

Mais ce classement n'est que théorique; il est indispensable de connaître l'importance réelle de chacun de ces facteurs dans le développement de l'angiogenèse.

Pour l'instant, on ignore tout de ce problème et il semble que seul le blocage de leur activité par un inhibiteur (qui dans ce cas peut être un anticorps) pourrait donner les informations nécessaires.

En second lieu, il faut tenir compte du fait qu'un traitement inhibant l'angiogenèse tumorale sera nécessairement prolongé et ne pourra être administré localement. Ce point permet d'éliminer a priori le TNF $\alpha$ , le FGF basique et les TGF  $\alpha$  et  $\beta$  qui ont tous les quatre trop d'effets biologiques pléiotropiques pour que leur inactivation prolongée ne perturbe gravement l'homéostasie tissulaire.

On remarquera que les trois facteurs les plus spécifi-

ques de l'angiogenèse : angiotropine, angiogénine et PDECGF sont de découverte assez récente et que, en comparaison avec les effecteurs précédemment cités, leurs effets biologiques ont été relativement peu étudiés.

En conséquence, il est nécessaire de confirmer la spécificité de leur activité avant de les choisir comme cible.

Parmi ces trois facteurs, l'angiotropine est le plus actif in vivo, mais sa structure n'est pas encore connue, l'angiogenèse agit in vivo par un mécanisme non encore modélisé in vitro, le PDECGF dont l'activité mitotique et chimiotactique semble spécifique des cellules endothéliales pourrait être le meilleur candidat.

### 3.3. LES COFACTEURS DE LA NEOVASCULARISATION

\*\*\*\*\*

En dehors des facteurs angiogéniques, il existe un certain nombre de molécules non directement angiogéniques, mais dont la présence semble, sinon indispensable, du moins favorable au développement de la néovascularisation.

#### 3.3.1. L'HEPARINE

L'importance de l'héparine dans la néovascularisation est suggérée par de nombreuses observations.

Kesler (Kesler et al 1976) montre que les mastocytes très riches en héparine s'accumulent dans l'environnement tumoral juste avant le déclenchement du processus d'angiogenèse.

In vitro, il est prouvé que les mastocytes sont capables de potentialiser la migration (Azizkhan et al. 1980) et la prolifération (Roche 1985) des cellules endothéliales capillaires. La suppression de ces effets par un traitement du lysat mastocytaire avec l'héparinase ou la protamine prouve que la substance responsable est bien l'héparine (Azizkhan et al. 1980).

Lorsque l'on examine les résultats concernant les effets de l'héparine, on constate certaines contradictions. Dans la plupart des cas, ces contradictions s'expliquent par le fait que l'héparine utilisée est un produit mal défini en taille et en composition chimique.

In vivo, l'héparine, seule, n'induit pas (Taylor et Folkman 1982) ou peu (Mac Auslan et al. 1983) la néovascularisation. Par contre, en association avec les effecteurs angiogénique, elle potentialise leurs activités (Castellot et al. 1986).

In vivo, l'association héparine + cuivre induit l'angiogénèse alors qu'aucune de ces molécules prises individuellement et aux mêmes doses, ne provoque de néovascularisation (Mac Auslan et al. 1983).

In vitro, l'héparine a le même type d'activité potentialisatrice.

En fonction des cellules et du type de facteur associé, l'héparine potentialise la prolifération à des concentrations variant de 0,1 à 1 ng/ml (Roche 1985). Le même type d'effet est observé pour la migration et la synthèse de l'activateur tissu-

laire du plasminogène à des concentrations plus fortes comprises entre 10 et 50 µg/ml (Azizkhan et al. 1980, Castellot et al. 1986).

Il semble que l'essentiel de l'effet de l'héparine soit dû à sa capacité d'interaction avec les FGF.

Les observations *in vitro*, qui ont montré que l'héparine augmentait la demie-vie des FGF acides ou basiques (Gospodarowicz et Cheng 1986) expliquent son activité potentialisatrice vis à vis de ces facteurs *in vivo* et *in vitro*. La capacité qu'a l'héparine à libérer les FGF de leurs liaisons avec les héparanes sulfates (Bashbin 1989) mis en évidence *in vivo* et *in vitro* par l'équipe de Mac Auslan (Mac Auslan et al. 1983) montre que l'héparine peut, dans certains cas, déclencher le processus de néovascularisation.

Si l'héparine joue un rôle de cofacteur angiogénique, elle apparaît comme essentielle dans le processus de néovascularisation depuis que l'équipe de Folkman (Taylor et Folkman 1982) a montré que la perfusion de protamine inhibait spécifiquement la vascularisation de métastases chez la souris. Malheureusement, ce traitement est trop toxique pour être envisagé chez l'homme. Mais la démonstration prouvant que les structures de l'héparine impliquées dans l'angiogenèse ne sont pas les mêmes que celles qui concernent son activité anticoagulante (Folkman 1985) permet d'envisager la recherche d'un inhibiteur spécifique de l'activité angiogénique de l'héparine.

### 3.3.2. LE CUIVRE

Plusieurs équipes ont montré que le cuivre était associé au processus de néovascularisation.

En examinant les fragments de cornées dans lesquelles l'angiogenèse est déclenchée grâce à un implant de prostaglandine, Ziche (Ziche et al. 1982) montre que ceux-ci contiennent une quantité de cuivre supérieure aux témoins.

Mac Auslan, en étudiant la composition chimique des facteurs angiogéniques, a mis en évidence du cuivre dans ces préparations (Mac Auslan et Reilly 1980). Chez les lapins dont la cuprémie est sensiblement abaissée, Gullino (Gullino 1986) montre que la réaction angiogénique est considérablement réduite.

In vivo, le cuivre n'est pas angiogénique, excepté à de fortes doses (50 µg à 5 mg) où cet effet est associé à une réaction inflammatoire (Mac Auslan 1983).

Associée à des molécules non angiogéniques telles que la ceruloplasmine, l'héparine ou le tripeptide Gly-His-Lys, le cuivre est angiogénique à des concentrations proches du microgramme (Raju et al. 1982).

La preuve d'une action directe du cuivre sur les cellules endothéliales a été apportée par l'équipe de Mac Auslan (Mac Auslan et Reilly 1980) qui montre, à la concentration optimum de 2 µM, le cuivre induit le chimiocinétisme des cellules endothéliales.

On est pour l'instant réduit à des hypothèses pour expliquer l'intervention du cuivre dans l'angiogenèse. Il peut agir directement en tant que catalyseur dans certaines réactions biochimiques nécessaires au développement de l'angiogenèse.

Il peut intervenir en tant qu'agent chemotactique des cellules inflammatoires bien que cette réaction ne soit pas indispensable au développement de l'angiogenèse tumorale.

Il peut agir en activant, in situ, des facteurs angiogéniques tels que le FGF pour lequel il a été récemment mis en évidence un site de liaison avec le cuivre (Shing 1988).

### 3.3.3. LES LIPIDES

Le rôle de certains lipides, en particulier des prostaglandines, a été évoqué dans la néovascularisation.

Les prostaglandines E sont angiogéniques in vivo, comme l'a montré Gullino (Gullino 1981).

Dans le modèle de la cornée de lapin, les PGE1 sont angiogéniques à des doses proches de 1 µg par dépôt alors que les PGF2 provoquent le même effet à des doses plus élevées (Gullino 1986).

Le rôle joué par les prostaglandines dans le développement de la néovascularisation n'est pas, à ce jour, élucidé. Il semble que les lipides agissent en mobilisant des facteurs directement angiogéniques (Raju et al. 1984) bien qu'il ait été

récemment démontré in vitro que les PGE2 pouvaient induire la migration et l'organisation en réseaux capillaires des cellules endothéliales (Kanayasu et al. 1989).

Il est prouvé que la concentration tumorale en prostaglandine est suffisamment élevée pour que ces facteurs puissent jouer un rôle dans la néovascularisation (Form et Auerbach 1983). De plus, l'équipe de Gullino (Ziche et al. 1982) a montré que l'angiogenèse déclenchée dans la cornée par un extrait tumoral, pouvait être inhibée grâce à un traitement à l'indométhacine.

Pour l'instant, les résultats concernant l'activité angiogénique des prostaglandines ne sont pas assez avancés pour que l'on puisse réellement évaluer et comprendre leur rôle au cours de l'angiogenèse tumorale.

4.      

EXTRAITS TISSULAIRES ET MOLECULES INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE
---

4.1.    EXTRAITS TISSULAIRES OU CELLULAIRES

\*\*\*\*\*

4.1.1.    TISSUS AVASCULAIRES

Très tôt, la recherche d'inhibiteurs de la néovascularisation s'est orientée vers l'utilisation de tissus avasculaires dont on suppose qu'ils contiennent naturellement des molécules bloquant leur vascularisation. Les sources principales sont le tissu cartilagineux et l'humeur vitrée. Ces tissus ne sont vascularisés qu'au cours de l'embryogenèse et sont rarement le siège de développements tumoraux.

4.1.1.1.    L'humeur vitrée

En tant que tissu avasculaire, l'humeur vitrée est une source potentielle d'inhibiteur de la vascularisation. Cette présomption est confortée par deux faits.

L'observation histologique du corps vitré au cours du développement embryonnaire montre que celui-ci est traversé par un système vasculaire qui régresse puis disparaît quelques jours avant la naissance pour laisser place à une structure transparente aux rayons lumineux (Jack 1982).

L'équipe de Folkman (Brem et al. 1976) a montré qu'une tumeur implantée dans l'humeur vitrée ne peut induire l'angi-



genèse, même placée à 0,1 mm des vaisseaux rétineux, alors que dans la cornée, une tumeur placée à la même distance de la circulation sanguine provoque une importante néovascularisation.

De nombreuses équipes ont cherché à isoler le ou les facteurs responsables de cette inhibition.

L'acide hyaluronique, qui est un constituant essentiel de l'humeur vitrée, est, à l'état natif, inhibiteur de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales (Kumaret West 1987). Mais cette molécule n'est pas le seul constituant qui joue un rôle inhibiteur de la néovascularisation.

L'équipe de Jacobson a isolé, à partir d'humeur vitrée ou de hyalocytes en culture de différentes espèces, une activité bloquant la prolifération des cellules endothéliales. La molécule responsable de cette activité a un poids moléculaire inférieur à 10000 Daltons (Jacobson et al. 1985).

Lutty et son équipe ont isolé une activité inhibitrice de l'angiogenèse déclenchée par un extrait rétinien sur le modèle de la membrane chorioallantoïque d'oeuf embryonné. In vitro, cette fraction est douée de propriétés antimitotiques vis à vis des cellules endothéliales et musculaires lisses. Cet inhibiteur est sensible aux protéases, résiste à un traitement de 10 mn à 95°C et à la hyaluronidase (Lutty et al. 1983 et 1985).

A l'heure actuelle, les molécules responsables des activités précédemment décrites n'ont pas encore été caractérisées sans doute à cause du manque de matériel biologique dont sont-

issus ces inhibiteurs. La mise en culture de cellules responsables devrait permettre leur production en quantité suffisante pour poursuivre leur identification.

#### 4.1.1.2. Le cartilage

Le cartilage est un tissu avasculaire qui, comme l'humeur vitrée, est vascularisé au cours de l'embryogenèse (Rissan et al. 1987). Des observations histologiques montrent que les chondrosarcomes sont peu ou pas vascularisés (Folkman 1971) et qu'un fragment de cartilage inhibe la vascularisation induite par les tumeurs dans les modèles de la membrane chorioallantoïque et de la cornée de lapin (Brem et Folkman 1975).

Toutes ces observations tendent à prouver que le cartilage peut être aussi la source d'inhibiteurs naturels de l'angiogenèse.

De fait, plusieurs auteurs ont pu isoler, à partir de tissus cartilagineux, un ou des facteurs solubles capables d'inhiber la néovascularisation.

Un certain nombre de ces facteurs sont, ou contiennent des inhibiteurs de trypsine ou de collagénase (Langer et coll. 1980, Kuettner et Pauli 1983).

On a pu isoler à partir d'extrait cartilagineux (Sorgente et Dorey 1980) ou de surnageant de culture de chondrocytes (Tagigawa et al. 1985) des fractions chromatographiques qui possèdent une activité inhibitrice de la prolifération des cellules

endothéliales, mais les molécules responsables de cette activité n'ont pas encore été caractérisées.

Actuellement il existerait deux types de molécules qui se distinguent en fonction de leur masse moléculaire. L'équipe de Sorgente travaille sur une molécule inhibant la prolifération de plusieurs types cellulaires, et dont le poids moléculaire est compris entre 1000 et 50000 Daltons, et l'équipe de Tabigawa travaille sur une molécule ayant les mêmes propriétés biologiques dont le poids moléculaire plus élevé est compris entre 100000 et 300000 Daltons. On ne sait pas s'il s'agit de formes polymérisées de la même molécule ou si celles-ci sont des entités différentes.

La caractérisation d'inhibiteur de l'angiogénèse extraits de tissus avasculaires, n'a jusqu'ici pas été concrétisée, alors que ce type de recherche suscitait beaucoup d'espoir il y a une dizaine d'années. Peut-être ceci est-il dû au fait que la plupart des activités mises en évidence jusqu'ici ne sont pas spécifiques des cellules endothéliales.

#### 4.1.2. LES PERICYTES

Les péricytes sont des cellules d'origine mésenchymateuse qui enveloppent les capillaires sanguins et sont intimement liés aux cellules endothéliales. Ils ont des propriétés contractiles, joueraient un rôle de maintien des structures capillaires, et, en outre, interviendraient dans la régulation de la

prolifération des cellules endothéliales capillaires (Sims 1986).

L'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par les péricytes a été confirmée par des expériences in vitro effectuées par l'équipe de D'Amore (D'Amore et Orlidge 1987) qui montre que cette inhibition nécessite un contact direct entre péricytes et cellules endothéliales.

Plus récemment, les mêmes auteurs ont étudié l'effet du FGF sur les cellules endothéliales, en culture, au contact de péricytes. Dans ces conditions, le FGF n'est actif qu'après une période de latence de 72 heures alors que son effet est immédiat s'il est mis en présence des seules cellules endothéliales (D'Amore et Orlidge 1988).

L'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales par les péricytes semble donc réversible. Sans doute est-elle modulée par l'expression de structures spécifiques à la surface des cellules endothéliales et des péricytes.

La difficulté de ces études repose sur le fait que l'isolement et le maintien en culture de péricyte est extrêmement difficile.

#### 4.2. LES MOLECULES INHIBITRICES DE L'ANGIOGENESE

\*\*\*\*\*

##### 4.2.1. LES STEROIDES ANGIOSTATIQUES

En 1983, l'équipe de Folkman (Folkman et al. 1983) a

montré que des fragments d'héparine ne possédant pas de propriétés anticoagulantes potentialisaient l'activité inhibitrice de la cortisone dans les modèles d'angiogenèse in vivo.

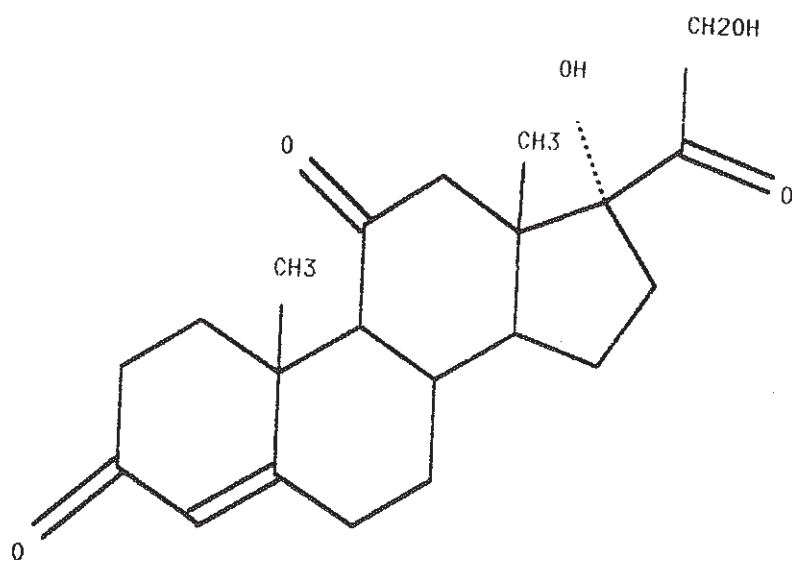
L'étude des structures chimiques impliquées dans cette activité a rapidement prouvé que la fonction minéralocorticoïde ou glycocorticoïde des stéroïdes n'était pas impliquée dans leur activité angiostatique (Crum et al. 1985).

Dans la figure ci-après, nous comparons la structure d'un stéroïde de type glucocorticoïde et d'un stéroïde angiostatique.

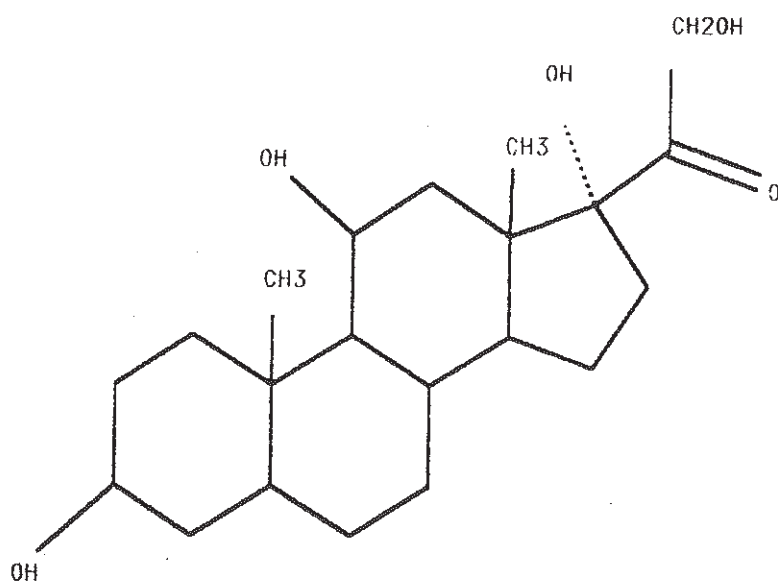
Les résultats des expériences menées pour mieux connaître les relations structure/activité de ces molécules suggèrent que l'activité angiostatique des stéroïdes est associée à la structure prégnane et à la nature des substituants portés par le cercle D. La double liaison du cycle A et le groupement hydroxyle en C11 du cycle C ne sont pas nécessaires à l'activité angiostatique alors que l'absence d'une fonction hydroxyle en 17 ou sur les carbones 20 et 21 du cycle D conduit à une nette diminution de l'activité angiostatique.

Ainsi, le tétrahydrocortisol, métabolite naturel de la cortisone, est le stéroïde angiostatique le plus efficace.

En étudiant des analogues de structure des héparines, Folkman a montré récemment que certaines cyclodextrines ont une activité potentialisatrice, des effets des stéroïdes angiostatiques, cent à mille fois plus forte que les fragments d'hépa-



Cortisone



Tétrahydrocortisol

FIGURE 8 - Structures développées de la cortisone et du tétrahydrocortisol

rines utilisés jusqu'ici (Folkman et al. 1989).

Les résultats sont dus à la structure caractéristique des cyclodextrines qui est telle que la surface externe de la molécule est très hydrophyle alors que le centre de la structure forme une cavité apolaire capable de se complexer à des molécules hydrophobes comme les stéroïdes.

Les cyclodextrines les plus actives sont constituées de sept unités de type glucopyranose dont on a augmenté l'hydrophilie grâce à des substituants sulfates. Dans ces conditions, l'inhibition de la vascularisation de la membrane chorioallantoïque est observée à des doses de 25 à 50  $\mu\text{g}$  de  $\beta$  cyclodextrine tétradécasulfate associé à 60  $\mu\text{g}$  de cortisone.

Dans ce type d'association, la cyclodextrine ne joue qu'un rôle de transporteur grâce à ses propriétés physicochimiques et à sa forte affinité pour les cellules endothéliales (Folkman et al. 1989) et c'est donc le stéroïde qui inhibe la néovascularisation.

On connaît mal le mécanisme d'action de ces stéroïdes qui semblent agir directement sur les cellules endothéliales. Les quelques données publiées sur ce sujet (Ingber et al. 1986) tendent à montrer que les stéroïdes angiostatiques n'agissent que sur les vaisseaux capillaires en formation. Cette activité se traduit par une dégradation de la fibronectine et la lamini-  
ne de la matrice extracellulaire en cours d'élaboration.

Il existe peu de résultats concernant l'efficacité de ce

traitement sur la vascularisation de tumeurs implantées chez les animaux. Les essais effectués en associant héparine et corticoïde nécessitent une dose très importante de stéroïde pour qu'une régression tumorale soit constatée (Folkman et Ingber 1985). En revanche, la découverte récente de l'efficacité supérieure d'une association  $\beta$  cyclodextrine/stéroïde permet d'envisager une thérapeutique angiostatique efficace.

#### 4.2.2. LE SULFATE DE PROTAMINE

Le sulfate de protamine a été proposé comme inhibiteur de l'angiogenèse.

In vitro, le sulfate de protamine inhibe la migration des cellules endothéliales induite par l'héparine et les cellules mastocytaires (Azizkhan et al. 1980).

In vivo, il inhibe l'angiogenèse embryonnaire mais n'est actif que sur les vaisseaux en formation. Injecté à des souris porteuses de tumeurs, le sulfate de protamine est capable d'inhiber la vascularisation tumorale (Taylor et Folkman 1982).

Le mécanisme d'action du sulfate de protamine n'est pas exactement connu. Il peut interagir avec l'héparine.

Mais Neufeld a montré qu'il pouvait avoir un rôle plus complexe (Neufeld et Gospodarowicz 1987). Avec les cellules endothéliales, le sulfate de protamine inhibe l'effet mitogène du FGF sur les cellules endothéliales, mais potentialise celui de l'EGF, ce qui tend à prouver qu'il agit sur un site cellu-



laire qui n'est pas associé au récepteur du FGF.

Le sulfate de protamine n'est pas un bon candidat en tant qu'agent angiostatique car il s'est révélé être très toxique lors des essais in vivo (Taylor et Folkman 1987). Quoi qu'il en soit, il peut tout à fait servir de modèle in vitro pour préciser son mécanisme d'action qui ne semble pas se réduire à une simple interaction physicochimique avec l'héparine.

#### 4.2.3. INTERFERON

Les interférons ont été décrits comme inhibiteurs de l'angiogénèse tumorale. L'interféron le plus actif est celui de type  $\beta$ . Il agirait en diminuant la production tumorale de facteurs angiogéniques car cette activité semble indépendante de ses propriétés antimétotiques (Sidky et Borden 1987).

Ce mécanisme d'action ne semble pas être le seul en cause car d'autres auteurs montrent que l'interféron de type  $\gamma$  est capable d'agir directement sur les cellules endothéliales en inhibant (in vitro) leur prolifération et en diminuant sensiblement la capacité des cellules myofibroblastiques à synthétiser la matrice extracellulaire nécessaire au développement du réseau capillaire (Tsurvoka et al. 1988).

Très récemment une équipe américaine a traité avec succès un enfant atteint d'hémangiomatose pulmonaire grâce à l'administration d'interféron de type  $\alpha 2$  a. L'hémangiomatose pulmonaire, qui se caractérise par la prolifération diffuse de

microvaisseaux, a complètement régressé après 14 mois de traitement (White et al. 1989).

Il existe encore peu de molécules qui puissent être utilisées de façon satisfaisante dans un traitement angiostatique. Seuls les stéroïdes angiostatiques et l'interféron peuvent actuellement susciter un espoir thérapeutique, mais ces molécules ne sont pas dénuées d'inconvénient.

Les stéroïdes angiostatiques ne sont pas suffisamment actifs in vivo pour être utilisés efficacement. A moins que la nouvelle association stéroïde/cyclodextrine se révèle réellement active in vivo. Les recherches dans ce domaine devront être poursuivies.

L'interféron qui, pour la première fois, a été utilisé avec succès dans le traitement d'un désordre angiogénique, provoque des effets secondaires importants. De plus, nous n'avons pas assez de recul en termes de nombre de patients traités et d'évolution de la maladie après traitement, pour conclure définitivement sur l'intérêt d'une telle thérapeutique.

5.

D I S C U S S I O N

Un nouvel axe de recherche, visant à inhiber l'angiogénèse tumorale, a été proposé depuis que l'on a constaté le rôle essentiel que joue la néovascularisation au cours du développement des tumeurs solides.

Cette approche originale présente, a priori, un avantage car la néovascularisation est un événement relativement rare dans l'organisme. De ce fait, la destruction ou l'inhibition du développement des vaisseaux néoformés devrait être suivie d'effets secondaires limités.

En outre, la population des cellules endothéliales impliquées dans l'angiogénèse présente un phénotype particulier qui les différencie de la masse de l'endothélium vasculaire qui ne doit pas être perturbé.

Enfin, ces cellules présentent un phénotype homogène, contrairement aux cellules tumorales qui peuvent échapper aux traitements cytostatiques grâce à leur diversité phénotypique.

Si cette approche n'a pas connu jusqu'à présent les succès escomptés, les raisons en sont multiples.

L'endothélium vasculaire, bien que représentant une masse de tissus au moins équivalente à celle du foie, est mal connu à cause de sa dispersion et de la diversité de ses fonctions spécifiques des organes qu'il irrigue.

Par ailleurs, le phénotype hautement différencié des cellules endothéliales est un obstacle très important à la mise en culture *in vitro*. En effet, la cellule endothéliale est très dépendante de son environnement cellulaire et matriciel qu'il est difficilement envisageable de recréer *in vitro*. L'isolement des cellules endothéliales capillaires à partir de tissus est déjà un exercice délicat car on obtient généralement une quantité de cellules limitée.

La culture de ces cellules *in vitro* est une étape limitative majeure qui nécessite des milieux de culture complexes auxquels on ajoute de multiples facteurs de croissance et d'attachement. La complexité de ces milieux rend les résultats expérimentaux souvent peu reproductibles et difficiles à comparer d'un laboratoire à l'autre.

Enfin, les cellules endothéliales en culture ont une durée de vie qui se limite à quelques passages.

Dans le cadre même de la conception d'un médicament inhibiteur de l'angiogenèse tumorale, nous devons élaborer des concepts de modélisation *in vitro* qui décomposent les différentes étapes de la néovascularisation.

Les trois étapes essentielles de l'angiogenèse que sont la dégradation de la membrane basale, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, sont plus ou moins difficiles à mettre en oeuvre, particulièrement dans le cas de l'étude de la migration. Ainsi nous serons fatalement limités dans

le choix des cibles, même si cette étape nous semble essentielle.

Si l'on ignore encore l'enchaînement des mécanismes moléculaires qui aboutissent à la formation de nouveaux vaisseaux, la plupart des cellules et des facteurs solubles impliqués dans l'angiogenèse sont maintenant bien caractérisés. Ces données nous permettent de classer les effecteurs angiogéniques en fonction de l'intérêt qu'ils représentent comme cible d'un inhibiteur de l'angiogenèse tumorale.

Un premier travail consiste à éliminer les cibles qui, dans l'état actuel de nos connaissances, ont peu de chance d'aboutir à la conception d'un inhibiteur spécifique de l'angiogenèse.

Il nous faut tout d'abord souligner que, contrairement à ce que l'on a longtemps supposé, les cellules tumorales ne secrètent pas de facteurs angiogéniques qui leur sont spécifiques. La tumeur ne fait que mobiliser les inducteurs de la néo-vascularisation normalement présents et dont la fonction physiologique est la réparation et la reconstitution des réseaux capillaires endommagés à la suite d'un traumatisme. Il est donc, selon nous, inutile de s'évertuer à rechercher des facteurs angiogéniques tumoraux qui pourraient servir de cible à un inhibiteur.

On ne peut envisager d'intervenir sur la régulation des récepteurs des cellules endothéliales aux différents composants de la matrice extra cellulaire, car ces récepteurs sont présents

à des degrés d'expression variables, sur tous les types cellulaires (Ruoslathi et Pierschbacher 1987).

Il en est de même pour toute une série de cytokines : FGF, TGF  $\alpha$ , TGF  $\beta$ , TNF, qui sont de puissants inducteurs ou modulateurs de l'angiogenèse, mais dont les effets pleiotropiques sont tels qu'il ne peut être envisagé de les inhiber sans risquer de provoquer de graves effets secondaires.

Les enzymes, tels que les activateurs du plasminogène, les héparanases et les héparitinases, qui jouent un rôle important dans le développement du processus de néovascularisation, sont aussi impliqués dans d'autres phénomènes physiologiques essentiels tels que la coagulation. Là aussi il n'est pas possible d'inhiber ces activités.

Ces contraintes étant posées, nous proposons trois axes dans la recherche d'inhibiteurs de la néovascularisation.

\* Le premier axe de recherche est lié à la constatation que les enzymes protéolytiques tels que la collagénase, jouent un rôle essentiel au cours de la première étape du phénomène angiogénique. La recherche d'inhibiteur de cette enzyme est déjà développée dans de nombreux laboratoires pour traiter diverses pathologies liées à la dégradation du collagène; elle devrait avoir une application dans l'inhibition de l'angiogenèse tumorale et ce d'autant plus qu'un tel inhibiteur agirait aussi sur l'activité métastatique des cellules cancéreuses, elle aussi dépendante de la dégradation du collagène.

\* Le deuxième axe de recherche consiste à isoler et caractériser des inhibiteurs naturels de la prolifération des cellules endothéliales. Cette recherche peut s'effectuer à partir de tissus ou de cellules potentiellement inhibiteurs de la néovascularisation tels que les tissus avasculaires (cartilage, humeur vitrée) ou les péricytes. Les composés isolés devront être testés sur une lignée de cellules endothéliales capillaires et une ou deux lignées non endothéliales (fibroblastes, cellules épithéliales) servant de contrôle de spécificité.

\* Enfin, le troisième axe de recherche plus prospectif peut s'appuyer sur la découverte récente de facteurs angiogéniques agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales.

Ce ou ces facteurs pourraient servir comme cible pour la recherche de nouveaux inhibiteurs naturels et de molécules de synthèse antagonistes conçus à partir de la connaissance des relations structures activité qui gèrent l'interaction de l'effecteur avec son récepteur.

Notons enfin que notre choix stratégique est aussi guidé par le fait que l'on ne dispose pas de moyens de traiter localement la néovascularisation tumorale.

Si les techniques de "drug targeting" permettaient de résoudre ce problème, il serait nécessaire de réviser ces choix.

C O N C L U S I O N

La recherche d'inhibiteurs de l'angiogenèse nous paraît être un axe stratégique majeur dans le traitement des tumeurs. Dérivé d'effets secondaires majeurs, un médicament issu de cette recherche devrait empêcher à la fois la croissance tumorale et le développement des métastases. Même s'il est sans doute nécessaire de l'associer à des drogues cytostatiques pour éradiquer complètement la tumeur, ce traitement, ayant comme cible ultime une cellule normale non transformée au phénotype stable qui ne se divise que très rarement, exception faite des situations pathologiques que nous cherchons à combattre, devrait permettre de traiter efficacement toutes les tumeurs solides.



B I B L I O G R A P H I E

ALBY L., AUERBACH R. Differential adhesion of tumor cells to capillary endothelial cells in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984), 81, 5739-5743.

ARNOLD F., WEST D., KUMAR S. Wound healing : the effect of macrophage and tumour derived angiogenesis factors on skin graft vascularization.

Br. J. Exp. Path. (1987), 68, 569-574.

ASSOIAN R.K., SPORN M.B. Type B transforming growth factor in human platelets : Release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells.

J. Cell Biol. (1986), 102, 1217-1223.

ASSOIAN R.K., FLEURDELYS B.E., STEVENSON H.C., MILLER P.J., MADTES D.K., RAINES F.W., ROSS R., SPORN M.B. Expression and secretion of type B transforming growth factor by activated human macrophages.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 6020-6021.

AUERBACH R., KUBAI L., KNIGHTON D., FOLKMAN J. A simple procedure for the long-term cultivation of chicken embryos.

Dev. Biol. (1974), 41, 391-394.

AUERBACH R. Angiogenesis inducing factors : A review. In : Lymphokine (1981), (PICKE ed), 4, pp. 69-88. Academic Press, New York.

AUERBACH R. Differential angiogenesis.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN eds),

pp. 131-133. Cold Spring Harbor Laboratory.

AUSPRUNK D.H., KNIGHTON D.R., FOLKMAN J. Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorio-allantois.

Amer. J. Pathol. (1975), 79, 597-618.

AUSPRUNK D.H., FOLKMAN J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis.

Microvasc. Res. (1977), 14, 63-65.

AUSPRUNK D.H. Distribution of hyaluronic acid and sulfated glycosaminoglycans during blood vessel development in the chick chorioallantoic membrane.

Amer. J. Anat. (1986), 177, 313-331.

AZIZKHAN R.G., AZIZKHAN J.C., ZETTER B.R., FOLKMAN J. Heparin stimulates migration of capillary endothelial cell in vitro.

J. Exp. Med. (1980), 152, 931-944.

BAIRD A., DURKIN T. Inhibition of endothelial cell proliferation by type B transforming growth factor : Interaction with acidic and basic fibroblast growth factors.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986), 138, 476-482.

BAIRD A., LING N. Fibroblast growth factors on present in the extracellular matrix produced by endothelial cell in vitro : Implication for a role of heparinase like enzymes in the neo-vascular response.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987), 142, 428-435.

BANDA M.J., KNIGHTON D.R., HUNT T.K., WERB Z. Isolation of a

non mitogenic angiogenesis factor from wound fluid.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982), 79, 7773-7777.

BANDA M.J., HERRON G.S., MURPHY G., WERB Z. Regulation of metalloproteinase activity by microvascular endothelial cells. In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 101-109. Cold Spring Harbor Laboratory.

BARNHILL R.L., RYAN T.J. Biochemical modulation of angiogenesis in the chorioallantoic membrane of the chick embryo. J. Invest. Dermatol. (1983), 21, 485-488.

BASHKIN P., DOCTROW S., KLAGSBRUN M., SUAHN C.M., FOLKMAN J., VLODAVSKY J. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparinlike molecules. Biochemistry (1989), 28, 1737-1743.

BERNACKI R.J., NIEDBALA M.J., KORYTNYK W. Glycosidases in cancer and invasion. Cancer Metastasis Rev. (1985), 4, 81-102.

BEUTLER B., CERAMI A. Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature (1986), 320, 584-588.

BICKNELL R., VALLEE B.L. Angiogenine activates endothelial cell phospholipase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 5961-5965.

BOUCHE G., CAS N., PRATS H., BALDIN V., TAUBER J.P., TEISSIE J., AMALRIC F. Basic fibroblast growth factor enters the nucleolus and stimulates the transcription of ribosomal gene in ABAE cells undergoing G<sub>0</sub> --> G<sub>1</sub> transition.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 6770-6774.

BOURDON M.A., RUOSLAHTI E. Tenascin mediates cell attachment through on R.G.D. dependent receptor.  
J. Cell Biol. (1989), 108, 1149-1155.

BOWERSOX J.C., SORGENTE N. Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin.  
Cancer Res. (1982), 42, 2547-2551.

BREM H., FOLKMAN J. Inhibition of tumour angiogenesis mediated by cartilage.  
J. Exp. Med. (1975), 141, 427-439.

BREM S., BREM H., FOLKMAN J., FINKELSTEIN D., PATZ A. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous.  
Cancer Res. (1976), 36, 2807-2812.

BRINGMAN T.S., LINDQUIST P.B., DERYNCK R. Different transforming growth factor species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor.  
Cell (1987), 48, 429-440.

BROWN R.A., WEISS J.B., TOMLINSON J.W., PHILLIPS P., KUMAR S. Angiogenic factor from synovial fluid resembling that from tumors.  
The Lancet (1980), 1, 682-685.

BORGESS A.W. Epidermal growth factor and transforming growth factor .  
Brit. Med. Bull. (1989), 45, 401-424.

CASTELLOT J.J., KAMBE A.M., DOBSON D.E., SPIEGELMAN B. Heparin

potentiation of 3T3 adipocyte stimulated angiogenesis :  
Mechanisms of action on endothelial cell.  
J. Cell Physiol. (1986), 127, 323-329.

CLIFF W.J. Observation on healing tissue : A combined light and  
electron microscopic investigation.  
Trans. Roy. Soc. London Ser. B (1963), 246, 305-325.

CRUM R., SZABO S., FOLKMAN J. A new class of steroids inhibits  
angiogenesis in the presence of heparin or a heparin fragment.  
Science (1985), 230, 1375-1378.

D'AMORE P.A., ORLIDGE A. The role of the pericyte in micro-  
vascular growth control.  
In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds),  
125-130. Cold Spring Harbor Laboratory.

D'AMORE P.A., ORLIDGE A. Growth factors and pericytes in micro-  
angiopathy.  
Diabete Metab. (1988), 14, 495-504.

DELLIBOVI P., CURALOTA A.M., KERN F.G., GRECO A., ITTMANN M.,  
BASILICO C. An oncogene isolated by transfection of Kaposi  
sarcoma DNA encodes a growth factor that is a member of the  
FGF family.  
Cell (1987), 50, 729-737.

DENEKAMP J. Vasculature as a target for tumour therapy.  
In : Prog. Appl. Microcirc. (1984), (HAMMERSEN F. and HUDLICKA  
O. Eds), vol. 4, pp. 28-38. Karger, Basel.

DERYNCK R., ROBERTS A., WINKLER M.E., CHEN E.Y., GOEDDEL D.V.  
Human transforming growth factor  $\alpha$ , precursor structure and  
expression in E. Coli.

DERYNCK R., JARRETT J.A., CHEN E.Y., EATON D.H., BELL J.R., ASSOIAN R.K., ROBERTS A.B., SPORN M.B., GOEDDEL D.V. Human transforming growth factor B complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells.

Nature (1985), 316, 701-705.

DERYNCK R. Transforming factor structure and biological activities.

J. Cell Biochem. (1986), 32, 293-304.

DERYNCK R., WINKLER M.E., SCHREIBER A.B. Transforming growth factor induces angiogenesis.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 72-77. Cold Spring Harbor Laboratory.

DERYNCK R. Transforming growth factor .

Cell (1988), 54, 593-595.

DROPULIC B., MASTERS C. Culture of mouse brain capillary endothelial cell lines that express factor VIII, glutamyl transpeptidase and form junctional complex in vitro.

In Vitro Cell Dev. Biol. (1987), 23, 775-781.

DUNN B.E., FITZHARRIS T.P., BARNETT B.B. Effects of varying chamber construction and embryo preincubation on survival and growth of chick embryos in shell less culture.

Anat. Rec. (1981), 199, 33-43.

DUSSEAU J.W., HUTCHINS P.M. Hypoxia induced angiogenesis in chick chorioallantoic membrane : a role for adenosine.

Resp. Physiol. (1988), 71, 33-34.

ENGERMAN R.L., PFAFFENBACH H.D., DAVIS M.D. Cell turnover of capillary.

Lab. Invest. (1967), 17, 738-743.

FEIGE J.J., BAIRD A. Glycosylation of the basic fibroblast growth factor receptor.

J. Biol. Chem. (1988), 263, 14023-14029.

FEINBERG R.N., BEEBE D.C. Hyaluronate in vasculogenesis.

Science (1983), 220, 1177-1179.

FELDMAN M., KOHTZ S., KLEINBERG D.L. Isolation and characterization of monoclonal antibodies against ribonuclease inhibitor.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988), 157, 286-294.

FENSELAV A., WATT S., MELLO R.J. Tumor angiogenic factor.

Purification from the Walker 256 rat tumor.

J. Biol. Chem. (1981), 256, 9605-9611.

FETT J. Cl., STRYDON D.J., LOBB R.R., ALDERMAN E.M., BETHUNE J.L., RIORDAN J.F., VALLEE B.L. Isolation and characterization of angiogenin an angiogenic protein from human carcinoma cells. Biochemistry (1985), 24, 5480-5486.

FIDDES J.C., WHANG J.L., MERGIA A., TUMOLO A., ABRAHAM J.A. Genes for the angiogenic growth factors : Basic and acidic fibroblast growth factors.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 24-31. Cold Spring Harbor Laboratory.

FOLKMAN J., MERLER E., ABERNATHY C., WILLIAMS G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis.

J. Exp. Med. (1971), 133, 275-288.

FOLKMAN J. Anti-angiogenesis : a new concept for therapy of solid tumors.

Ann. Surg. (1972), 175, 409-416.

FOLKMAN J., COTRAN R. Relation of vascular proliferation to

tumor growth.

International Review of Experimental Pathology (1976), 16, 207-248.

FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C.C., ZETTER B.B. Long term culture of capillary endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76, 5217-5221.

FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C.C. Angiogenesis in vitro Nature (1980), 288, 551-556.

FOLKMAN J. Angiogenesis : initiation and control.

Ann. N.Y. Acad. Sci. (1982), 401, 212-227.

FOLKMAN J., LANGER R., LINDHART R.J., HAUDENSCHILD C., TAYLOR S. Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. Science (1983), 221, 719-725.

FOLKMAN J. Regulation of angiogenesis : a new function of heparin. Biochem. Pharmacol. (1985), 34, 905-909.

FOLKMAN J., INGBER D.E. Angiostatic steroids : Methods of discovery and mechanism of action.

Ann. Surg. (1987), 206, 374-383.

FOLKMAN J., KLAGSBURN M. Angiogenic factors.

Science (1987), 235, 442-447.

FOLKMAN J., WEISZ P.B., JOULLIE M.M., LI W.W., EWING W.R.

Control of angiogenesis with synthetic heparin substitutes.

Science (1989), 243, 1490-1493.

FORM D., PRATT B.M., MADRI J.A. Endothelial cell proliferation during angiogenesis. In vitro modulation by basement membrane



components.

Lab. Invest. (1986), 55, 521-530.

FRATER-SCHRÖDER M., MULLER G., BIRCHMEIER W., BOHLEN P. Transforming growth factor beta inhibits endothelial cell proliferation.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986), 137, 295-302.

FRATER-SCHRÖDER M., RISAU W., HALLMANN R., GAUTSCHI P., BOHLEN P. Tumor necrosis factor type  $\alpha$ , a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro is angiogenic in vivo.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 5277-5281.

FRIESEL R., MACIAG T. Internalization and degradation of heparin binding growth factor I by endothelial cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988), 151, 957-964.

FURCHT L.T. Critical factors controlling angiogenesis : Cell products, cell matrix and growth factors.

Lab. Invest. (1986), 55, 505-509.

GAUTSCHI-SAUVA P., JIANG Z.P., FRATER-SCHRÖDER M., BOHLEN P. Acidic fibroblast growth factor is present in non neural tissue : Isolation and chemical characterization from bovine kidney.

Biochemistry (1987), 26, 5844-5847.

GIMBRONE M.A., COTRAN R.S., LEAPMAN S.B., FOLKMAN J. Tumor growth and neovascularization : an experimental model using the rabbit cornea.

J. Nat. Cancer Inst. (1974), 52, 413-417.

GOETZ I.E., WARREN J., ESTRADA C., ROBERTS E., KRAUSE D. Long term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adulte bovine brain.

In Vitro Cell Develop. Biol. (1985), 21, 172-180.

GOLDFARB R.H., LIOTTA L.A. Proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis.

Semin. Thromb. Hemostasis (1986), 12, 294-307.

GOLDSMITH J.C., Mc CORMICK J.J., YEN A. Endothelial cell cycle kinetics. Changes culture and correlation with endothelial properties.

Lab. Invest. (1984), 51, 643-647.

GOSPODAROWICZ D., CHENG J., LUI G.M., BAIRD A., ESCH F., BOHLEN P. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor.

Endocrinology (1985), 117, 2383-2391.

GOSPODAROWICZ D., CHANG J. Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation.

J. Cell Physiol. (1986), 128, 475-484.

GOSPODAROWICZ D., NEUFELD G., SCHWEIGERER L. Fibroblast growth factor : Structural and biological Properties.

J. Cell Physiol. (1987), 5, 15-26.

GREENBLATT M., SHUBIK P. Tumor angiogenesis : transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique.

J. Nat. Cancer Inst. (1968), 41, 111-124.

GROSS J.L., MOSCATELLI D., RIFKIN D.B. Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80, 2623-2627.

GULLINO P.M. Angiogenesis Factor(s).

Handbook of experimental Pharmacology (1981), 57, 417-449.

GULLINO P.M. Considerations on the mechanism of the angiogenic response.

Anticancer Res. (1986), 6, 153-158.

HARPER J.W., VALLEE B.L. A covalent angiogenin/ribonuclease hybrid with a fourth disulfide bond generated by regional mutagenesis.

Biochemistry (1989), 28, 1875-1884.

HARRIS-HOOKER S.A., GAJDUSEK C.M., WIGHT T.N., SCHWARTZ S.M. Neovascular responses induced by cultured aortic endothelial cells.

J. Cell Physiol. (1983), 114, 302-310.

HEIMARK R.L., TWARDZIK D.R., SCHWARTZ S.M. Inhibition of endothelial regeneration by type beta transforming growth factor from platelets.

Science (1986), 233, 1078-1080.

HERRON G.S., BANDA M.J., CLARK E.J., GAURILOUIC J., WERB Z. Secretion of metalloproteinase by stimulated capillary endothelial cells.

J. Biol. Chem. (1986), 261, 2814- 2818.

HÖCKEL M., SASSE J., WISSLER J.H. Purified monocyte-derived angiogenic substance (Angiotropin) stimulates migration, phenotypic changes, and tube formation but not proliferation of capillary endothelial cell in vitro.

J. Cell Physiol. (1987), 133, 1-13.

HOSHI H., Mac KEEHAN W.L. Isolation, growth requirements, cloning, prostacyclin production and life span of human adult endothelial cells in low serum culture medium.

In Vitro Cell Develop. Biol. (1986), 22, 51-56.

HUDLICKA O. Growth of vessels. Historical review.  
In : Prog. Appl. Microcirc. (1984), (F. HAMMERSEN and O. HUD-  
LICKA Eds), vol. 4, pp. 1-8. S. KARGER, Basel.

INGBER D.E., MADRI J.A., FOLKMAN J. A possible mechanism for  
inhibition of angiogenesis by angiostatic steroids : Induction  
of capillary basement membrane dissolution.  
Endocrinology (1986), 119, 1768-1775.

INGBER D.E., MADRI J.A., FOLKMAN J. Endothelial growth factors  
and extracellular matrix regulate DNA synthesis through modula-  
tion of cell and nuclear expansion.  
In Vitro Cell Develop. Biol. (1987), 23, 387-393.

ISHIKAWA F., MIYAZONO K., HELLMAN V., DREXLER H., WERNSTEDT C.,  
HAGIWARA K., USUKI K., TAKAKU F., RISAU W., HELDIN C.H.  
Identification of angiogenic activity and the cloning and ex-  
pression of platelet derived endothelial cell growth factor.  
Nature (1989), 338, 557-562.

JACK R.L. Regression of the hyaloïd vascular system : an ultra-  
structural analysis.  
Amer. J. Ophthalmol. (1972), 74, 261-272.

JACOBSON B., DORFMAN T., BASU P.K., HASANY S.M. Inhibition of  
vascular endothelial cell growth and trypsin activity by vitreous.  
Exp. Eye Res. (1985), 41, 581-595.

JAKOB W., JENTZSCH K.D., MAUERBERGER B., HEDER G. The chick  
embryo chorioallantoïc membrane as a bioassay for angiogenic  
factors : Reactions induced by carrier materials.  
Exp. Path. (1978), 15, 241-249.

JAKOB W., VOSS K. Utilization of image analysis for the quanti-  
fication of vascular responses in the chick chorioallantoïc

membrane.

Exp. Path. (1984), 26, 93-99.

JANZER R.C., RAFF M.C. Astrocytes induce bloodbrain barrier properties in endothelial cells.

Nature (1987), 325, 253-257.

JENSEN J.A., HUNT T.K., SCHEVENSTUHL H., BANDA M.J. Effects of lactate, pyruvate and pH on secretion of angiogenesis and mitogenesis factors by macrophages.

Lab. Invest. (1986), 54, 574-578.

JONES E.Y., STUART D.I., WALKER N. Structure of tumour necrosis factor.

Nature (1989), 338, 225-228.

JOSEPH-SILVERSTEIN J., MOSCATELLI D., RIFKIND B. The development of a quantitative R.I.A. for basic fibroblast growth factor using polyclonal antibodies against the 157 aminoacid form of human b FGF.

J. Immunol. Method. (1988), 110, 183-192.

KALEBIC T., GARBISA S., GLASER B., LIOTTA L.A. Basement membrane collagen : Degradation by migrating endothelial cells.

Science (1983), 221, 281-283.

KANAYASU T., NAKAO-HAYASHI J., ASUWA N., MORITA I., ISHII T., ITO H., MUROTA S.I. Leucotriene C4 stimulates angiogenesis in bovine carotid artery endothelial cells in vitro.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1989), 159, 572-578.

KERN P.A., KNEDLER A., ECKEL R.H. Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue.

J. Clin. Invest. (1983), 71, 1822-1829.

KESSLER D.A., LANGER R., PLESS N.A., FOLKMAN J. Most cells and tumor angiogenesis.

Int. J. Cancer (1976), 18, 703-709.

KLAGSBRUN M., KNIGHTON D., FOLKMAN J. Tumor angiogenesis activity in cells grown in tissue culture.

Cancer Res. (1976), 36, 110-114.

KLAGSBRUN M., SASSE J., SULLIVAN R., SMITH J.A. Human tumor cells synthesize an endothelial cell growth factor that is structurally related to basic fibroblast growth factor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83, 2448-2452.

KNIGHTON D., AUSPRUNK D., TAPPER D., FOLKMAN J. Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo.

Br. J. Cancer (1977), 35, 347-356.

KNIGHTON D.R., HUNT T.K., SCHEVENSTUHL H., HALLIDAY B.J., WERB Z., BANDA M.J. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages.

Sciences (1983), 221, 1283-1285.

KNIGHTON D., SCHUMERTH S., FIEGEL V. Environmental regulation of macrophage angiogenesis.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 150-154. Cold Spring Harbor Laboratory.

KRAAL G., DULJVESTIJN A.M., HENDRIKS H.H. The endothelium of the high endothelial venule : A specialized endothelium with unique properties.

Exp. Cell Biol. (1987), 55, 1-10.

KRAMER R.H., FUH G.M., KARASEK M.A. Type IV collagen synthesis by cultured human microvascular endothelial cells and its deposition into the subendothelial basement membrane.

Biochemistry (1985), 24, 7423-7430.

KUETTNER K.E., PAULI B.U. Inhibition of neovascularization by a cartilage factor.

In : Development of the vascular system (1983), Ciba Foundation Symposium, 100, pp. 163-173. Pitman, London.

KULL F.C., BRENT D.A., PARIKH I., CUATRECASAS P. Chemical identification of a tumor derived angiogenic factor. Science (1987), 236, 843-845.

KUMAR S., WEST D., DANIEL L.M., HANCOCK A., CARR T. Human lung tumor cell line adapted to grow in serum free medium secretes angiogenesis factor.

Int. J. Cancer (1983), 32, 461-464.

KUMAR S., WEST D. Hyaluronic acid and its degradation products modulate angiogenesis in vivo and in vitro.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 90-94. Cold Spring Harbor Laboratory.

LANGER R., FOLKMAN J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules.

Nature (1976), 263, 797-799.

LANGER R., CONN H., VACANTI J., HAUDENSCHILD G., FOLKMAN J.

Control of tumor growth in animals by infusion of an angiogenesis inhibitor.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980), 77, 4331-4335.

LANGER R., BROWN L., EDELMAN E. Controlled release and magnetic-ally modulated release systems for macromolecules.

In : Methods in Enzymology (1985), (WIDDER K.J., GREEN R. Rds), vol 112, pp. 399-422.

LEE D.C., ROSE T.M., WEBB N.R., TODARO G.J. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor .  
Nature (1985), 313, 489-491.

LEE F.S., SHAPIRO R., VALLEE B.L. Tight binding inhibition of angiogenesis and ribonuclease A by placental ribonuclease inhibitor.  
Biochemistry (1989), 28, 255-230.

LEIBOVICH S.J., POLVERINI P.J., SHEPARD H.M., WISEMAN D.M., SHIVELY V., NUSEIR N. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumor necrosis factor .  
Nature (1987), 329, 630-632.

LIBERMANN T.A., FRISEL R., JAYE M., LYALL R.M., WESTERMERK B., DROHAN W., SCHMIDT A., MACIAG T., SCHLESSINGER J. An angiogenic factor is expressed in human ghoma cells.  
EMBO J. (1987), 6, 1627-1632.

LOBB R.R., HARPER J.W., FETT J.W. Purification of heparin binding growth factors.  
Anal. Biochem. (1986), 154, 1-14.

LUTTY G.A., LIU S.H., PRENDERGAST R.A. Angiogenic lymphobine of actived T cell origin.  
Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. (1983), 24, 1595-1601.

LUTTY G.A., THOMPSON D.C., GALLUP J.Y., MELLOR R.J., PATZ A., FENSELAU A. Vitreous : An inhibitor of retinal extract induced neovascularization.  
Invest. Ophtalmol. Vis. Sci. (1983), 23, 52-56.

LUTTY G.A., MELLO R.J., CHANDLER M.C., FAIF C., BENNETT A., PATZ A. Regulation of cell growth by vitreous humour.  
J. Cell Sci. (1985), 76, 53-65.



Mac AUSLAN B.R., HANNAN G.M., REILLY W., STEWART F.H. Variant endothelial cells. Fibronectin as a transducer of signal for migration and neovascularisation.

J. Cell Physiol. (1980), 104, 177-186.

Mac AUSLAN B.R., REILLY W. Endothelial cell phagocytosis in response to specific metal ions.

Exp. Cell Res. (1980), 130, 147-157.

Mac AUSLAN B.R., REILLY W., HANNAN G.N., GOLE G.A. Angiogenic factors and their assay : activity of formyl methionyl-leucyl-phenylalanine, adenosine diphosphate, heparin, copper, bovine endothelium stimulating factor.

Microvascular Res. (1983), 26, 323-338.

MADRI J.A., PRATT B.M. Endothelial cell matrix interaction : In vitro models of angiogenesis.

J. Histochem. Cytochem. (1986), 34, 85-91.

MADRI J.A., PRATT B.M., TUCKER A.M. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor B depends upon the composition and organisation of the extra cellular matrix.

J. Cell Biol. (1988), 106, 1375-1384.

MADTES D.K., RAINES E.W., SAKARIASSEN K.S., ASSOIAN R.K., SPORN M.B., BELL G.I., ROSS R. Induction of transforming growth factor  $\beta$  inactivated human alveolar macrophage.

Cell (1988), 53, 285-293.

MAGNALDO T., L'ALLEMAIN G., CHAMBARD J.C., MOENNER M., BARRITAULT D., POUYSSEGUR J. The mitogenic signaling pathway of fibroblast growth factor is not mediated through polyphosphoinositide hydrolysis and protein kinase C activation in hamster fibroblast.

J. Biol. Chem. (1986), 261, 16916-16922.

MANTOVANI A., MING W.J., BALOTTA C., ABDELJALIL B., BOTTAZZI B. Origin and regulation of tumor associated macrophages : the role of tumor-derived chemotactic factor.  
Biochim. Biophys. Acta (1986), 865, 59-67.

MARAGOUDAKIS M.E., SARMONIKA M., PANOUTSACOPOULOU M. Inhibition of basement membrane biosynthesis prevents angiogenesis.  
J. Pharm. Exp. Ther. (1988), 244, 729-733.

MARX J.L. Angiogenesis research comes of age.  
Science (1987), 237, 23-24.

MASSAGUE J. Epidermal growth factor like transforming growth factor. Interaction with epidermal growth factor receptors in human placenta membrane and A 431 cells.  
J. Biol. Chem. (1983), 258, 13614-13620.

MERGIA A., EDDY R., ABRAHAM J.A., FIDDES J.C., SHOWS T.B. The genes for basic and acidic fibroblast growth factors are on different human chromosomes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1986), 138, 644-651.

MIYAZONO K., OKABES T., URABE A., TAKAKU F., HELDIN C.H. Purification and properties of an endothelial cell growth factor from human platelets.  
J. Biol. Chem. (1987), 262, 4098-4103.

MIYAZONO K., HELDIN C.H. Role for carbohydrate structures TGF B 1 latency.  
Nature (1989), 338, 158-160.

MOENNER M., BADET J., CHEVALLIER B., TARDIEU M., COURTY J., BARRITAU D. Eye derived growth factors : Receptors and early event studies.  
In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 52-57. Cold Spring Harbor Laboratory.

MONTESANO R., ORCI L. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vitro.

Cell (1985), 42, 469-477.

MONTESANO R., VASSALI J.D., BAIRD A., GUILLEMIN R., ORCI L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83, 7297-7301.

MORRIS P.B., HIDA T., BLACKSHEAR P.J., KLINTWORTH G.K., SWAIN J.L. Tumor-promoting phorbol esters induce angiogenesis in vivo.

Am. J. Physiol. (1988), 254, C 318 - C 322.

MOSCATELLI D., PRESTA M., RIFKIN D. Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis and migration.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83, 2091-2095.

MOSCATELLI D. High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells : Absence of a role for low affinity binding in the stimulation of the plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells.

J. Cell. Physiol. (1987), 131, 123-130.

MOSCATELLI D., JOSEPH-SILVERSTEIN J., PRESTA M., RIFKIN D.B. Multiple forms of an angiogenesis factor : basic fibroblast growth factor.

Biochimie (1988), 70, 83-87.

MOSCATELLI D., RIFKIN D.B. Membrane and matrix localization of proteinase : a common theme in tumor cell invasion and angiogenesis.

Biochim. Biophys. Acta (1988), 948, 67-85.

MOSTAFA L.K., JONES D.B., WRIGHT D.H. Mechanism of the induction

of angiogenesis by human neoplastic lymphoid tissue : studies on the chorioallantoic membrane of the chick embryo.

J. Pathol. (1980), 132, 191-205.

MULLER G., BEHRENS J., NUSSBAUMER U., BOHLEN P., BIRCHMEIER W. Inhibitory action of transforming growth factor B on endothelial cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 5600-5604.

MOLLINS D.E., RIFKIN D.B. Stimulation of motility in cultured bovine capillary endothelial cell by angiogenic preparation.

J. Cell Physiol. (1984), 119, 247-254.

NAGY J.A., BROWN L.F., SENGER D.R., LANIR N., VAN DER WATER L., DVORAK A.M., DVORAK H.F. Pathogenesis of tumor stroma generation a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition.

Biochim. Biophys. Acta (1988), 948, 305-326.

NAKAJIMA M., IRIMURA T., NICHOLSON G.L. Heparanases and tumor metastasis.

J. Cell Biochem. (1988), 36, 157-167.

NEUFELD G., GOSPODAROWICZ D. Protamine sulfate inhibits mitogenic activities of the extracellular matrix and fibroblast growth factor, but potentiates that of epidermal growth factor.

J. Cell Physiol. (1987), 132, 287-294.

NEUFELD G., GOSPODAROWICZ D. Identification of the fibroblast growth factor receptor in human vesicular endothelial cells.

J. Cell Physiol. (1988), 136, 537-542.

OBRENOVITCH A., MONSIGNY M. Angiogenese tumorale.

Pathol. Biol. (1986), 34, 189-201.

OHTSU A., FUJI K., KUROZUMI S. Induction of angiogenic response by chemically stable prostacyclin analogs.

Prostagland. Leuk. Essent. Fatty (1988), 33, 35-39.

OKAMOTO T., OIKAWA S., TOYOTA T., GOTO Y. Angiogenesis factors in ocular tissues of normal rabbits on chorio allantoic membrane assay.

J. Exp. Med. (1988), 154, 63-70.

PALMER K.A., SCHERAGA H.A., RIORDAN J.F., VALLEE B.L. A preliminary three dimensional structure of angiogenin.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83, 1965-1969.

PHILLIPS P., KUMAR S. Tumour angiogenesis factor (TAF) and its neutralisation by a xenogenic autiserum.

Int. J. Cancer (1979), 23, 82-88.

POLVERINI P.J., COTRAN R.S., GIMBRONE M.A., UNANUE E.R. Activated macrophages induce vascular proliferation.

Nature (1977), 269, 804-806.

PRESTA M., RUSNATI M., MAIER J.A.M., RAGNOTTI G. Purification of basic fibroblast growth factor from rat brain identification of a Mr 22.000 immunoreactive form.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988), 155, 1161-1172.

RAJU K.S., ALESSANDRI G., ZICHE M., GULLINO P.M. Ceruloplasmin, copper ions and angiogenesis.

J. Nat. Cancer Inst. (1982), 69, 1183-1188.

RAJU K., ALESSANDRI G., GULLINO P. Characterization of a chemo-attractant for endothelium induced by angiogenesis effectors.

Cancer Res. (1984), 44, 1579-1584.

REYNOLDS L.P., MILLAWAY D.S., KIRSCH J.D., INFELD J.E., REDMER

D.A. Angiogenic activity of placental tissues of cows.  
J. Reprod. Fertil. (1987), 81, 233-240.

RIFKIN D.B., SAKSELA O., MOSCATELLI D., PRESTA M., MIGNATTI P.,  
OSSOWSKI L. Studies on the regulation of protease activity during  
cell invasion and angiogenesis.  
In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds),  
pp. 110-113. Cold Spring Harbor Laboratory.

RIORDAN J.F., VALLEE B.L. Human angiogenin an organogenic protein.  
Brit. J. Cancer (1988), 57, 587-590.

RISAU W., HALLMAN R., SARIOLA H., EKBLUM P., KEMLER R., DOET-  
SCHMAN T. Regulation of embryonic bloodvessel development.  
In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds),  
pp. 134-138. Cold Spring Harbor Laboratory.

RISAU W., LEMMON V. Changes in the vascular extracellular matrix  
during embryonic vasculogenesis and angiogenesis.  
Develop. Biol. (1988), 125, 441-450.

RIZZINO A. Transforming growth factor B : multiple effects on  
cell differentiation and extracellular matrix.  
Develop. Biol. (1988), 130, 411-422.

ROBERTS A.B., SPORN M.B., ASSOIAN R.K., SMITH J.M., ROCHE N.S.,  
WAKEFIELD L.M., HEINE U.I., LIOTTA L.A., FALANGA V., KEHRL J.H.,  
FAUCI A.S. Transforming growth factor type B : Rapid induction  
of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen  
formation in vitro.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83, 4167-4171.

ROBERTS A.B., SPORN M.B. Transforming growth factor B : Stimul-  
ation or inhibitor of angiogenesis ?  
In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds),

pp. 69-71. Cold Spring Harbor Laboratory.

ROCHE W. Mast cells and tumour angiogenesis. The tumour mediated release of an endothelial growth factor from mast cells. Int. J. Cancer (1985), 36, 721-728.

RUOSLAHTI E., PIERSCHBACHER M. New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins. Science (1987), 238, 491-497.

St CLAIR D.K., RYBAK S.M., RIORDAN J.F., VALLE B.L. Angiogenin abolishes cell-free protein synthesis by specific ribonucleolytic inactivation of 40S ribosomes. Biochemistry (1988), 27, 7263-7268.

SAKAGUCHI M., KAJIO T., KAWAHARA K., KATO K. Antibodies against basic fibroblast growth factor inhibit the autocrine growth of pulmonary artery endothelial cells. Febs Lett. (1988), 233, 163-166.

SAKSELA O., MOSCATELLI D., RIFKIN D.B. The opposing effect of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta on the regulation of plasminogen activator activity in capillary endothelial cells. J. Cell Biol. (1987), 105, 957-963.

SAKSELA O., MOSCATELLI D., SOMMER A., RIFKIN D.B. Endothelial cell derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protect it from proteolytic degradation. J. Cell Biol. (1988), 107, 743-751.

SATO N., FUKUDA K., NARIUCHI H., SAGARA N. Tumor necrosis factor inhibiting angiogenesis in vitro. J. Nat. Cancer Inst. (1987), 78, 115-120.

SATO N., SAWASAKI Y., SENOO A., FUSE Y., HIRANO Y., GOTO T.  
Development of capillary networks from rat microvascular frag-  
ments in vitro : The role of myofibroblastic cells.  
Microvascular Res. (1987), 33, 194-210.

SATO Y., RIFKIN D.B. Autocrine activities of basic fibroblast  
growth factor : Regulation of endothelial cell movement, plasmino-  
gen activator synthesis and DNA synthesis.  
J. Cell Biol. (1988), 107, 1199-1205.

SCHOR A.M., SCHOR S.L., WEISS J.B., BROWN R.A., KUMAR S., PHIL-  
LIPS P. Stimulation by a low molecular weight angiogenic factor  
of capillary endothelial cells in culture.  
Brit. J. Cancer (1980), 41, 790-799.

SCHOR A.M., SCHOR S.L. Tumour angiogenesis.  
J. Pathol. (1983), 141, 385-413.

SCHREIBER A.B., WINKLER M.E., DERYNCK R. Transforming growth  
factor : A more potent angiogenic mediator than epidermal growth  
factor.  
Science (1986), 232, 1250-1253.

SCHWEIGERER L., MALERSTEIN B., GOSPODAROWICZ D. Tumor necrosis  
factor inhibits the proliferation of cultured capillary endo-  
thelial cells.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1987), 143, 997-1004.

SCHWEIGERER L., NEUFELD G., FRIEDMAN J., ABRAHAM J., FIDDES J.,  
GOSPODAROWICZ D. Capillary endothelial cells express basic fibro-  
blast growth factor a mitogen that promotes their own growth.  
Nature (1987), 325, 257-259.

SCHWEIGERER L. Basic fibroblast growth factor and its relation



to angiogenesis in normal and neoplastic tissues.  
Klin. Wochenschr (1988), 66, 340-345.

SHAHABUDDIN S., KUMAR S., WEST D., ARNOLD F. A study of angiogenesis factors from five different sources using a radioimmunoassay.  
Int. J. Cancer (1985), 35, 87-91.

SHAPIRO R., RIORDAN J.F., VALLEE B.L. Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin.  
Biochemistry (1986), 25, 3527-3532.

SHAPIRO R., STRYDOM D.J., OLSON K.A., VALLEE B.L. Isolation of angiogenin from normal human plasma.  
Biochemistry (1987), 26, 5141-5146.

SHAPIRO R., VALLEE B.L. Human placenta ribonuclease inhibitor abolishes both angiogenic and ribonucleolytic activities of angiogenin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 2238-2241.

SHEPRO D., D'AMORE P. Physiology and biochemistry of the vascular wall endothelium.  
In : Handbook of physiology : The cardiovascular system (1984), (RENKIN E.M. and MICHEL C.C. Eds), vol. IV Microcirculation Part 1, pp. 103-164, Baltimore waverly.

SHING Y., FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C., LUND D., CRUM R., KLAGSBRUN M. Angiogenesis is stimulated by a tumor-derived endothelial cell growth factor.  
J. Cell Biochem. (1985), 29, 275-287.

SHING Y. Heparin-copper bioaffinity chromatography of fibroblast growth factors.

J. Biol. Chem. (1988), 263, 9059-9062.

SHOLLEY M.M., FERGUSON G.P., SEIBEL H.R., MONTOUR J.L., WILSON J.D. Mechanisms of neovascularization : Bascular sprouting can occur without proliferation of endothelial cells.  
Lab. Invest. (1984), 51, 624-634.

SIDKY Y.A., AUERBACH R. Lymphocyte-induced angiogenesis : a quantitative and sensitive assay of the graft.vs.host reaction.  
J. Exp. Med. (1975), 141, 1084-1100.

SIDKY Y.A., BORDEN E.C. Inhibition of angiogenesis by interferous : Effect of tumor and lymphocyte induced vascular responses.  
Cancer Res. (1987), 47, 5155-5161.

SIMS D.E. The pericyte a review.  
Tissue Cell (1986), 18, 153-174.

SINKOVICS J.G. Oncogenes and growth factors.  
CRC Crit. Rev. Immunol. (1988), 8, 217-298.

SORGENTE N., DOREY K. Inhibition of endothelial cell growth by a factor isolated from cartilage.  
Exp. Cell. Res. (1980), 128, 63-71.

SQUIRES C., CHILDS J., EISENBERG S., POLVERINI P., SOMMER A. Production and characterization of human basic fibroblast growth factor from Escherichia Coli.  
J. Biol. Chem. (1988), 263, 16297-16302.

STARKSEN N. HARSHIV G., GIBBS V., WILLIAMS L. Regulated expression of the platelet derived growth factor A chain gene in microvascular endothelial cells.  
J. Biol. Chem. (1987), 262, 14381-14384.

STOCKLEY A. The chorioallantoic membrane of the embryonic chick as an assay for angiogenic factors.

Br. J. Dermatol. (1980), 102, 738-741.

STRYDOM D., FETT J., LOBB R., ALDERMAN E., BETHUNE J., RIORDAN J., VALLEE B. Aminoacid sequence of human tumor derived angiogenin.

Biochemistry (1985), 24, 5486-5494.

TAYLOR S., FOLKMAN J. Protamine is an inhibitor of angiogenesis. Nature (1982), 297, 307-312.

THOMAS K. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor.

In : Method in enzymology : Peptides Growth factor 1987 (BARNES D., SIRBASKU D. Eds), 147 b, pp. 120-135, Academic Press.

THOMAS K. Transforming potential of fibroblast growth factor genes.

Trends Biochem. Sci. (1988), 13, 327-328.

THOMPSON N., FLANDERS K., SMITH J., ELLINGSWORTH L., ROBERTS A., SPORN M. Expression of transforming growth factor B1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice.

J. Cell Biol. (1989), 108, 661-669.

TIMPI R., MANN K., AUMAILLEY M., DEUTZMANN R., EDGAR D., NURCOMBE V., GERL M. Structure and biology of the laminin-nidogen complex.

In : Biologie et pathologie moléculaire de la matrice extracellulaire (1988). Colloque du 25ème anniversaire de la Société Française du Tissu Conjonctif.

TSURUOKA N., SUGIYAMA M., TAWARAGI Y., TSUJIMOTO M., NISHIHARA T., GOTO T., SATO N. Inhibition of in vitro angiogenesis by

lymphotoxin and interferon .

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1988), 155, 429-435.

VALLEE B., RIORDAN I., LOBB R., HIGACHI N., FETT J., CROSSLEY G., BUHLER R., BUDZIK G., BREDDAM K., BETHUNE J., ALDERMAN E. Tumor-derived angiogenesis factors from rat Walker-256 Carcinoma : an experimental investigation on review.

Experientia (1985), 41, 1-14.

VAN MOURIK J., LAWRENCE D., LOSKUTOFF D. Purification of an inhibitor of plasminogen activator (Antiactivator) synthesized by endothelial cells.

J. Biol. Chem. (1984), 259, 14914-14921.

VLODAVSKY I., FOLKMAN J., KLAGSBRUN M. Heparin binding endothelial/cell growth factor are sequestered by the extracellular matrix.

In : Angiogenesis (1987), (D.B. RIFKIN and M. KLAGSBRUN Eds), pp. 58-64. Cold Spring Harbor Laboratory.

VLODAVSKY I., MICHAELI R., BARNER M., FRIEDMAN R., HOROWITZ A., FUKS Z., BIRAN S. Involvement of heparanase in tumor metastasis and angiogenesis.

Isr. J. Med. Sci. (1988), 24, 464-470.

VU M., BURGER P., KLINTWORTH G. Angiogenic activity in injured rat corneas as assayed on the chick chorioallantoic membrane.

Lab. Invest. (1985), 53, 311-319.

VU M., SMITH C., BURGER P., KLINTWORTH G. Methods in laboratory investigation : An evaluation of methods to quantitate the chick chorioallantoic membrane assay in angiogenesis.

Lab. Invest. (1985), 53, 499-508.

WAGNER R. Endothelial cell embryology and growth.

Adv. Microcirc. (1980), 9, 45-75.

WAHL S., HUNT D., WAKEFIELD L., Mc CARTENEY F., WAHL L., ROBERTS A., SPORN M. Transforming growth factor type B induces monocytes chemotaxis and growth factor production.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987), 84, 5788-5792.

WALL R., HARKER L., STRIKER G. Human endothelial cell migration. Stimulation by a released platelet factor.

Lab. Invest. (1978), 39, 523-529.

WARREN B. The vascular morphology of tumors.

In : Tumor blood circulation : Angiogenesis, vascular morphology and blood flow of experimental human tumor (1979), (H.I. PETERSON Ed.), pp. 1-47, CRC Press, Boca, Raton.

WATT S., KIRCHMAYER D., AUERBACH R. Mitogenic and chemokinetic effect of secondary M.L.C. supernatants on cultured endothelial cells.

In : Interlinkins, lymphokines and cytokines : Proceeding of the third international lymphokine workshop (1983), (J.J. OPPENHEIM and S. COHEN Eds) p. 317, Academic Press New York.

WATT S., AUERBACH R. A mitogenic factor from endothelial cells obtained from mouse secondary mixed leukocyte cultures.

J. Immunol. (1986), 136, 197-202.

WEINER H., WEINER L., SWAIN J. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin.

Science (1987), 237, 280-282.

WEST D., HAMPSON I., ARNOLD F., KUMAR S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid.

Science (1985), 228, 1324-1326.

WHITE C., SONDEIMER H., CROUCH E., WILSON H., FAN L. Treatment of pulmonary hemangiomas with recombinant interferon alfa 2a.

N. Engl. J. Med. (1989), 320, 1197-1200.

WISEMAN D., POLVERINI P., KAMP D., LEIBOVICH S. Transforming growth factor-beta (TGF B) is chemotactic for human monocytes and induces their expression of angiogenic activity.

Biochem. Biophys. Res. Commun (1988), 157, 793-800.

WISSLER J., LOGEMANN E., MEYER H., KRUTZFELDT B., HOCKEL M., HELLMAYER L. Structure and function of a monocytic blood vessel morphogen (angiotropin) for angiogenesis in vivo and in vitro. A copper containing metallopolypeptide as a novel and unique type of monokine.

Protides Biol. Fluids (1980), 34, 525-536.

WONG S., WINCHELL L., Mac CUNE B., EARPH, TELXIDO J., MASSAGUE J., HERMAN B., LEE D. The TGF precursor expressed on the cell surface binds to the EGF receptor on adjacent cells, leading to signal transduction.

Cell (1989), 56, 495-506.

ZETTER B., AZIZKHAN R., AZIZKHAN J., BROUTY-BOYE D., FOLKMAN J., HAUDENSCHILD C., KLAGSBRUN M., POTASH R., SCHEINER C. Normal and tumor derived factors that modulate endothelial cell growth and migration.

In : Plasma and cellular modulatory proteins (1981) (D. BING Ed.), pp. 59-74, Center for Blood Research Boston.

ZETTER B. Assay of capillary endothelial cell migration.

In : Method in enzymology : Peptides growth factor 1987 :

(BARNES D. and SIRBASKU D. Eds), 147 b, pp. 135-144, Academic Press.

ZICHE M., JONES J., GULLINO P. Role of prostaglandin E1 and copper in angiogenesis.

J. Nat. Cancer Inst. (1982), 69, 475-482.

## R E S U M E

Le développement tumoral est dépendant de la néovascularisation ou angiogénèse provoquée par des facteurs solubles.

L'inhibition de la néovascularisation constitue une approche thérapeutique anticancéreuse originale. Les cellules endothéliales capillaires, qui forment les nouveaux vaisseaux, subissent des modifications phénotypiques dont les principales sont la synthèse de protéases, la migration et la prolifération.

Récemment, il a été développé un certain nombre de modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro*, qui permettent de quantifier l'ensemble du phénomène angiogénique ou les différents événements qui le composent.

Grâce à ces modèles, on a pu isoler et caractériser les cellules et les molécules susceptibles d'être impliquées dans la néovascularisation tumorale. L'utilisation des modèles expérimentaux et les connaissances acquises sur les mécanismes moléculaires qui régulent la néovascularisation devraient permettre de développer une nouvelle approche plus spécifique de la thérapeutique anticancéreuse, visant à inhiber l'angiogénèse tumorale.

---

### M o t s   c l e f s

Néovascularisation  
Angiogénèse tumorale  
Facteurs de croissance  
Inhibiteurs