

Remodelage des vaisseaux tumoraux

Jean Plouët

Centre de Recherches cardiovasculaires Inserm Lariboisière U 689, Institut des Vaisseaux et du Sang, Hôpital Lariboisière, Paris

Les facteurs angiogéniques induisent une cascade d'événements conduisant à la formation de néovaisseaux. Or à la phase d'état de ces néovascularisations pathologiques, ce ne sont plus des vaisseaux « paranormaux », c'est-à-dire des vaisseaux rentrant dans un programme d'angiogenèse que l'on doit cibler mais des **vaisseaux profondément remodelés** dans lesquels les cellules endothéliales ne sont pas les seules à avoir subi des modifications phénotypiques.

Ce n'est que depuis moins de 5 ans que l'on s'intéresse, principalement sous l'impulsion des travaux du groupe de Rakesh Jain, à comprendre le paradoxe existant entre la destruction des néovaisseaux par des traitements anti-angiogéniques et l'amélioration de l'efficacité des traitements de chimiothérapie et de radiothérapie alors que l'hypoxie qui devrait être créée par l'éradication des vaisseaux devrait produire l'effet inverse. D'où l'hypothèse que ces traitements pourraient produire une éradication des néovaisseaux, puis secondairement favoriser la reconstruction des contacts entre cellules luminales et murales des vaisseaux, les rendant ainsi matures, moins tortueux, moins dilatés et moins perméables, et que donc **cette normalisation favoriserait une meilleure diffusion aux agents de chimiothérapie [1].**

Composante luminale du remodelage des vaisseaux pathologiques

Angiogenèse-vasculogénèse

La néovascularisation tumorale ne se résume pas à la formation de néovaisseaux à partir des vaisseaux préexistants, en particulier les capillaires et les veinules post-capillaires. Ce processus résulte aussi de la vasculogénèse, c'est-à-dire de la colonisation et de l'expansion de précurseurs médullaires de cellules endothéliales (CE) au sein des tumeurs. Cette notion est actuellement battue en brèche car il est difficile de les individualiser dans les vaisseaux tumoraux par les marqueurs connus de précurseurs (CD34, VEGFR-2, CD133), bien que leur accumulation dans le sang circulant signe un processus vasculaire intense et que le bevacizumab inhibe leur mobilisation à partir de la moelle attestée par leur numération, effondrée par l'injection du bevacizumab [2]. Par ailleurs,

l'observation chez une dizaine de patients ayant reçu une greffe de moelle d'un donneur du sexe opposé, puis ayant développé un cancer, n'a pas permis de visualiser ces progéniteurs transplantés dans les vaisseaux tumoraux. Donc si ces progéniteurs ne résident pas dans les néovaisseaux tumoraux, une théorie propose actuellement que leur contact avec **les cellules endothéliales tumorales pourrait** permettre, même lors d'une rencontre furtive, de **délivrer des facteurs pro-angiogéniques**, encore non identifiés. L'observation selon laquelle les vaisseaux tumoraux présentent une hyperperméabilité, une tortuosité, une dilatation, associées à une raréfaction des péricytes permettant l'extravasation de fibrine formant une matrice provisoire, lit sur lequel migrent et prolifèrent les cellules endothéliales angiogéniques a permis au groupe de Harold Dvorak de postuler l'existence du *vascular permeability factor* (VPF) sécrété par les cellules cancéreuses et de l'identifier en 1983 [3]. Le VPF n'est autre que le VEGF.

Phénotype artériel

Outre l'angiogenèse et la vasculogénèse, un troisième phénomène caractérise les néovaisseaux pathologiques : **le remodelage perpétuel leur conférant l'acquisition d'un phénotype artériel** visualisé par l'expression de marqueurs connus lors de l'embryogenèse pour induire une spécification artérielle telle que Notch-1, éphrine B2, neuropiline-1. Bien sûr, l'acquisition de ces marqueurs de spécification artérielle n'est pas définie seulement par un contrôle génétique dû au VEGF : il n'est pas exclu que les perturbations du flux, dues à l'augmentation de la pression interstitielle, puissent induire cette surexpression. Il a en effet été démontré qu'au cours de l'embryogenèse, l'inversion du flux dans un modèle de membrane chorioallantoïdienne supprime l'expression de certains marqueurs de spécification artérielle [4].

Le rôle pro ou anti-angiogénique de la voie Notch située en aval des récepteurs du VEGF est controversé. Pour certains, l'activation intracellulaire d'un partenaire, obtenue par transfection, exerce un effet anti-angiogénique, pour d'autres, dont notre laboratoire, l'interruption de cette voie par des ligands compétitifs agissant par voie extracellulaire, inhibe l'angiogenèse. Nous avons démontré dans un modèle de souris transgéniques exprimant l'antigène T de

SV40 sous le contrôle du promoteur anti-thrombine et qui développent un hépatocarcinome selon une cinétique tout à fait superposable à la pathologie humaine (hyperplasie, dysplasie, et tumeur maligne) [5] que Notch-4, Delta-4 et éphrine B2 sont surexprimés dans les sinusoides selon une cinétique superposable à la cancérogenèse. De plus, le VEGF active la voie Notch-4/Delta-4 nécessaire aux fonctions de différenciation et de migration, mais pas de prolifération, du VEGF [6] (figure 1). Récemment, le groupe de Harris a confirmé l'intérêt du ciblage de Notch-4 car il est au moins 10 fois plus exprimé dans les CE tumorales que dans les CE des vaisseaux normaux dans le cancer du rein [7]. Nous avons confirmé l'intérêt fonctionnel de cette voie Notch/Delta par la démonstration que la dimérisation de Notch par un ligand dimérique mime les effets de différenciation de VEGF sans affecter leur prolifération. De plus, l'inhibition de cette voie par un ligand monomérique, empêchant donc la signalisation Delta vers Notch, bloque l'angiogenèse. Ainsi donc l'acquisition de marqueurs artériels dans les vaisseaux tumoraux pourrait permettre de constituer de nouvelles cibles pour détruire les vaisseaux tumoraux.

Mosaïque

Une autre anomalie de la composante luminale est constituée par la mosaïque, c'est-à-dire que toute la lumière n'est pas décorée d'une façon homogène par des anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules endo-

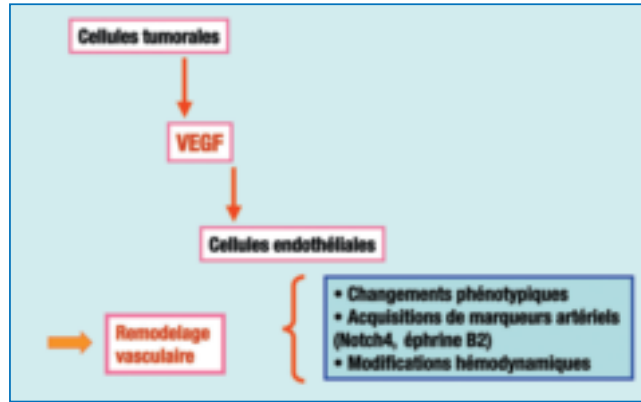


Figure 1. Remodelage vasculaire dans l'hépatocarcinome. Sous l'effet du VEGF sécrété par les hépatocytes transgéniques, les cellules endothéliales expriment des marqueurs d'artères comme Notch-4 et éphrine B2 (d'après [6]).

théliales mais qu'ils peuvent aussi contenir des marqueurs de cellules cancéreuses.

Certains travaux du groupe de Jain ont permis de calculer que ce passage des cellules cancéreuses à travers la paroi, en route pour l'essaimage métastatique, nécessite environ 48 heures. Il n'est toujours pas clairement établi si ces cellules sont des cellules endothéliales qui ont acquis un phénotype tumoral ou l'inverse. D'autres travaux plus récents suggèrent que la mosaïque serait constituée par un dépôt de fibrine [8]. Par ailleurs, le mythe de la balance angiogénique voudrait que dans les vaisseaux tumoraux une hyper-sécrétion de facteurs proangiogéniques s'accompagne d'une répression des facteurs anti-angiogéniques : en ce cas, on comprend mal comment les thérapies anti-VEGF induiraient l'apoptose des cellules endothéliales des néovaisseaux sans affecter les vaisseaux stables. En pratique, plusieurs stratégies de recherche de gènes surexprimés dans les cellules endo-

théliales angiogéniques ont mis en évidence des facteurs anti-angiogéniques, donc d'adaptation au VEGF, ce qui n'a rien d'étonnant car on ne voit pas pourquoi la mise en place de néovaisseaux pathologiques échapperait à la physiologie des rétrocontrôles. Ainsi la vasohibine [9] est surexprimée dans plusieurs modèles de néovascularisation pathologique chez l'adulte, son inhibition stimule la vascularisation, et inversement son injection réduit la néovascularisation. Une démarche similaire conduite dans notre laboratoire a permis de démontrer que la Netrine-4 est aussi un facteur d'adaptation au VEGF (Brevets, Plouët, PCT 2003, PCT 2005).

Composante murale du remodelage des vaisseaux pathologiques

Anomalies des péricytes

Il est bien connu depuis plusieurs décennies qu'à la phase d'état des néovascularisations pathologiques, les remaniements vasculaires observés ne se restreignent pas aux cellules endothéliales. Dans la rétinopathie diabétique, par exemple, la raréfaction des péricytes favorise la formation de microthrombi, donc de l'hypoxie précédant l'apparition de la prolifération vasculaire. Cette observation a été à l'origine de la quête du « facteur X » sécrété par les rétines hypoxiques qui n'a été élucidée qu'en 1994 [10]. La disparition des péricytes matures (exprimant les marqueurs aSMA, NG2 et desmine) lors de l'initiation du processus angiogénique est bien établie mais l'observation par plusieurs groupes de la destruction des péricytes (exprimant le PDGFR α ou PDGFR β , SMA) par des inhibiteurs de la phosphorylation du PDGFR α [11] constitue un paradoxe. En fait, il semble que sous le même nom, deux cellules différentes interviennent de façon opposée dans la vascularisation tumorale.

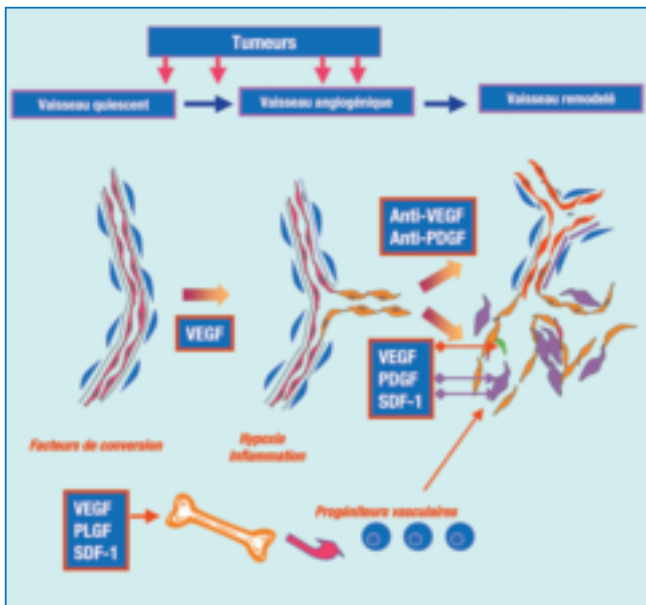


Figure 2. Représentation schématique de la déstructuration et de la normalisation des vaisseaux tumoraux. Sous l'effet de l'hypoxie ou de l'inflammation, des facteurs de conversion phénotypique rendent les cellules endothéliales sensibles à l'action mitogène du VEGF (orange). La couverture péricytaire (bleue) diminue. Dans la moelle osseuse, le VEGF, le PlGF, SDF-1 mobilisent des progéniteurs endothéliaux (vert) et muraux (violet) exprimant les PDGFR qui prolifèrent dans les vaisseaux tumoraux. Sous l'effet combiné de thérapies anti-VEGF et anti-PDGF, les cellules endothéliales recouvrent un phénotype quiescent, les cellules murales sont maturées en péricytes exprimant la desmine.

De nouvelles cibles

Le groupe de Ferrara a démontré que chez les souris invalidées sur le VEGF, le PDGF était surexprimé. Par ailleurs, le PDGFAA a été caractérisé comme le facteur chimiotactique majeur des fibroblastes sécrété par les cellules cancéreuses, choisies parmi celles qui résistent au bevacizumab (qui ne reconnaît pas le VEGF murin). Cela laisse supposer une contribution majeure du VEGF mural stromal à la tumorigenèse. **L'inhibition du PDGFAA ou des PDGFR atténue la vascularisation tumorale [12].** Le suivi histologique démontre une plus forte concentration de PDGFR α à la périphérie de la tumeur, la zone la plus active de prolifération, et une extinction de cette expression au cours de la différenciation, ou de la maturation, à l'inverse d'autres marqueurs de péricytes comme l'aSMA. Le groupe de Bergers a récemment brillamment illustré ce concept en démontrant que les cellules murales PDGFR β sont d'origine médullaire et qu'elles viennent coloniser les vaisseaux tumoraux où elles maintiennent la survie des cellules endothéliales. De façon intéressante, ces cellules expriment les marqueurs aSMA et NG2 mais pas la desmine. Au cours de leur maturation, à condition qu'il existe un contact entre cellules endo-

théliales et cellules murales, la desmine apparaît et le PDGFR β s'effondre [13]. Ainsi donc, la mesure de l'expression de la desmine (« les bons péricytes ! ») et des PDGFR (« les mauvais péricytes ! ») pourrait revêtir un intérêt diagnostique en ce qui concerne la maturation des cellules murales.

Cette propriété a été étudiée dans notre laboratoire et les résultats préliminaires de xéno-greffes de cellules de cancer de la prostate ou du côlon résistant au bevacizumab, transfectées par un agent anti-angiogénique présentent une augmentation de la desmine pour une mesure de densité microvasculaire peu ou pas modifiée, ce qui suggère que la maturation des cellules murales pourrait constituer une voie de ciblage antitumorale. Un travail remarquable du groupe de Elie Keshet étend ce paradigme : ayant recherché des progéniteurs médullaires endothéliaux dans les vaisseaux tumoraux, le groupe n'en a pas trouvé, mais au contraire a découvert l'existence de cellules d'origine médullaire, dites « accessoires » constituées de monocytes et démontré le rôle prépondérant du SDF-1 dans le recrutement de ces cellules par les vaisseaux tumoraux [14] (figure 2).

Conséquences cliniques de la normoangiogenèse

Les preuves expérimentales de la normalisation des vaisseaux tumoraux sont encore parcellaires et restreintes à un tout petit nombre de laboratoires. L'idée centrale de la recherche préclinique repose sur la mesure de la pression interstitielle et de la fraction hypoxique des tumeurs sous l'effet d'agents anti-VEGF. Il semble qu'un **traitement dirigé contre le VEGF ou le VEGFR-2 est rapidement suivi d'une réoxygénation de la tumeur la rendant plus sensible à la radiothérapie** et à une diminution de la perméabilité, provoquant une diminution de la pression interstitielle, donc **une meilleure diffusion des agents de chimiothérapie**. Pour le groupe de Jain, il s'établirait **une fenêtre thérapeutique** pendant laquelle la réoxygénation et la baisse de la pression interstitielle se maintiendraient grâce à une couverture accrue des cellules endothéliales par les péricytes par le biais de l'angiopoïétine et de la

dégradation des matrices extracellulaires anormalement épaisses [15]. Une trop forte pression anti-angiogénique provoquerait une résistance au VEGFR-2 et une reprise de la réaction angiogénique. Il est peut-être difficile d'imaginer que dans les tumeurs humaines, l'extrême hétérogénéité de la vascularisation des tumeurs primaires et des métastases les rendent aussi sensibles à l'établissement d'une fenêtre thérapeutique. Le concept de normalisation vasculaire n'a pas encore été très documenté chez l'homme. La publication princeps du groupe de Willett [2] démontrait sur 6 patients atteints de cancer du colon métastatique traités par le bevacizumab une réduction de la pression interstitielle, du nombre de cellules endothéliales tumorales, des progéniteurs endothéliaux circulants, une augmentation de la couverture péricytaire des cellules endothéliales intratumorales. Ces résultats devraient être étendus à la mesure des acteurs de la vascularisation et de sa normalisation comme les facteurs d'adaptation au VEGF et les marqueurs de « péricytes » dont on a vu que les PDGFR signeraient l'activation conduisant à la survie des CE angiogéniques tandis que la desmine certifierait la normalisation.

Jusqu'à présent, la quête de facteurs circulants ou locaux prédictifs de l'activité vasculaire des tumeurs, ou de leur réponse aux traitements s'est limitée à la mesure des acteurs de l'activation endothéliale et elle n'a pas apporté de résultat tangible. **Le concept de normalisation ouvre une nouvelle voie** de recherche de facteurs prédictifs et thérapeutiques fondés sur la complexité des contacts entre cellules lumorales et murales. Gageons que dans les prochaines années, nous verrons éclore de nouvelles stratégies thérapeutiques de la résistance aux agents anti-VEGF ciblant les cellules murales ou les cellules accessoires. ▲

Références

- Jain RK, et al. *Nat Med* 2001 ; 7 : 987-9.
- Willett CG, et al. *Nat Med* 2004 ; 10 : 145-7.
- Senger DR, et al. *Science* 1983 ; 219 : 983-5.
- Le Noble F, et al. *Development* 2004 ; 131 : 361-75.
- Dupuy E. *Hepatology*, 2003 ; 38 : 793-802.
- Hainaud P, et al. *Cancer Res* 2006, sous presse.
- Patel NS, et al. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 8690-7.
- Di Tomaso E, et al. *Cancer Res* 2005 ; 65 : 5740-9.
- Watanabe K, et al. *J Clin Invest*. 2004 ; 114 : 898-907.
- Malecaze F, et al. *Arch Ophthalmol* 1994 ; 112 : 1476-82.
- Ropert S. *VEGF Actu* 2006 ; 2 : 4.
- Tejada ML, et al. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 2676-88.
- Song S, et al. *Nat Cell Biol* 2005 ; 7 : 870-9.
- Grunewald M, et al. *Cell* 2006 ; 124 : 175-89.
- Winkler F, et al. *Cancer Cell* 2004 ; 6 : 553-63.

SIA Séminaires Internationaux d'Angiogenèse

SIA Nord / Normandie / Picardie
1 & 2 décembre 2004

SIA Grand Est
17 & 18 novembre 2004

SIA Ile-de-France
13 & 14 octobre 2004

SIA Grand Ouest
2 & 3 février 2007

SIA Rhône-Alpes / Auvergne
17 novembre 2004

SIA Grand Sud-Ouest
8 & 9 décembre 2004

PROGRAMME

- L'angiogenèse normale et pathologique
- Modulation pharmacologique de l'angiogenèse
- Surrogate markers
- Historique des essais thérapeutiques anti-angiogéniques
- Management du risque lié à la prescription des anti-angiogéniques

IVS Pour tout renseignement, s'adresser au contact avec l'Attaché Scientifique Roche Groupes