

## **Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire : de la biologie cellulaire à la clinique**

**Michael S. Pepper**

L'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est essentielle pour la croissance et l'homéostasie. Ce processus implique le mouvement et la différenciation de cellules endothéliales et non endothéliales (péricytes, cellules musculaires lisses), dont le résultat final est la morphogenèse d'un arbre vasculaire complexe et multifonctionnel. La compréhension des mécanismes de base de ce processus au niveau moléculaire a permis de réévaluer leur rôle dans la pathogénie de plusieurs maladies, par exemple la croissance tumorale, les rétinopathies et les malformations vasculaires telles que les angiomes. Par ailleurs, la compréhension de phénomènes physiologiques, tels que la réparation tissulaire, la fertilité (modification de la muqueuse utérine, ovulation, croissance du corps jaune) et la formation de vaisseaux collatéraux en cas d'ischémie, a aussi bénéficié de ces nouvelles connaissances. Ainsi, l'angiogenèse représente, par excellence, un domaine de transfert rapide de connaissances entre science fondamentale et médecine clinique.

**L'**angiogenèse est essentielle dans la vie pré- et post-natale pour la croissance et l'homéostasie. Au cours de l'embryogenèse, aussi bien que chez l'adulte, des nouveaux vaisseaux prennent naissance initialement comme de simples tubes de cellules endothéliales. Certains deviennent ensuite des capillaires après différenciation et apposition de

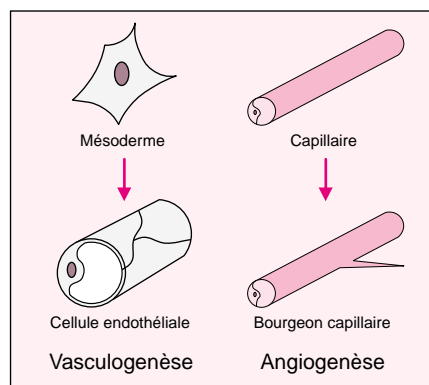
péricytes; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grand calibre (artères, veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de manière concentrique ou longitudinale, selon les besoins fonctionnels.

Au cours du développement embryonnaire, la formation du système cardiovasculaire débute par la

### ADRESSE

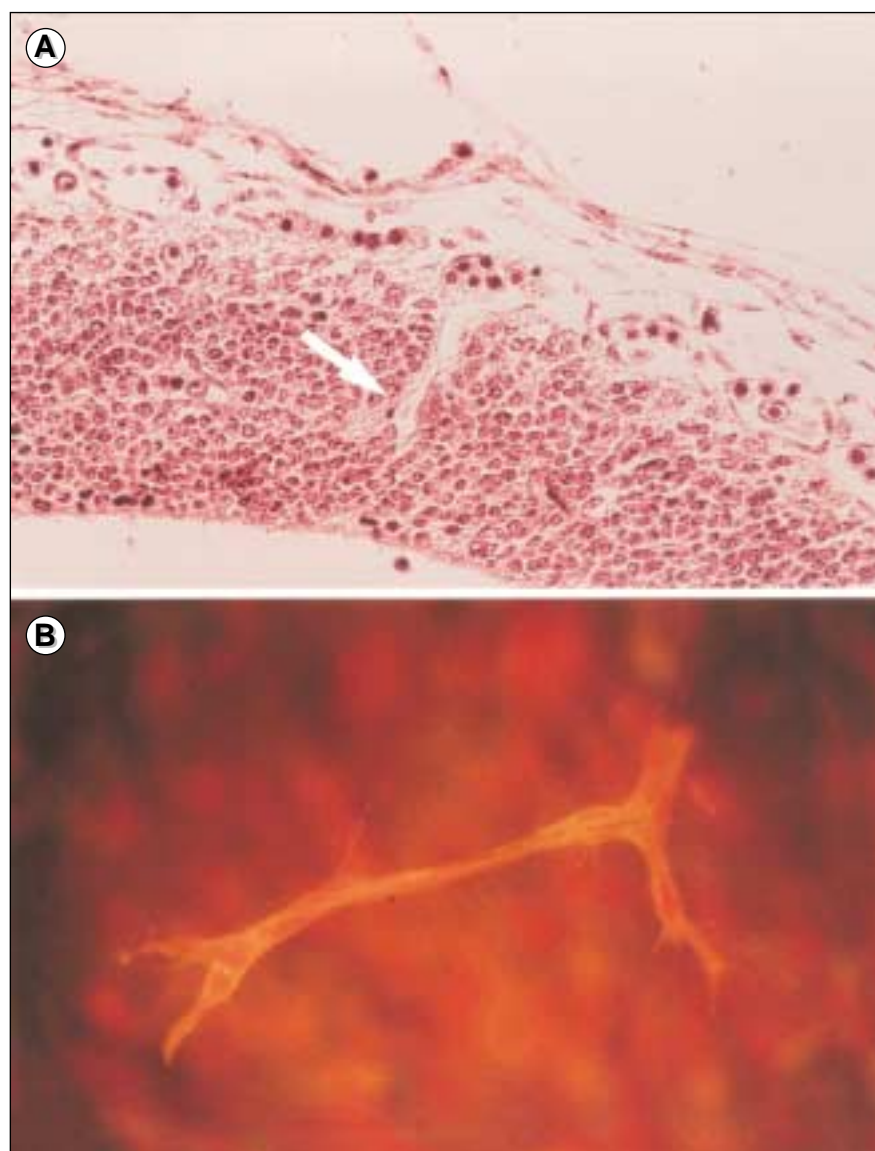
M.S. Pepper: Département de morphologie, Centre médical universitaire, 1, rue Michel-Servet, 1211 Genève, Suisse.

vasculogénèse, processus qui donne naissance à un réseau primitif de structures vasculaires (comme le tube endocardique et les rudiments de l'aorte dorsale) par différenciation de cellules endothéliales *in situ* à partir de précurseurs mésenchymateux, les angioblastes [1] (*figure 1*), eux-mêmes dérivés de cellules souches plus primitives, les hémangioblastes (*m/s 1998, n° 5, p. 662*). La vascularisation de certains organes (par exemple, les poumons) est également effectuée par vasculogénèse, tandis que d'autres (par exemple, le système nerveux central) sont vascularisés par un processus d'angiogénèse (*figure 2A*), c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux à partir de cellules endothéliales préexistantes (*figure 1*). Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par angiogénèse. Néanmoins, il a récemment été démontré que le sang contient des angioblastes, qui contribuent à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, aussi bien lors de l'embryogénèse que dans la vie postnatale [2-4] (*Tableaux I et II*).



**Figure 1. Vasculogénèse et angiogénèse.** Les nouveaux vaisseaux sanguins se forment par deux processus distincts : (1) la vasculogénèse, c'est-à-dire la différenciation *in situ* de précurseurs mésenchymateux (angioblastes) en cellules endothéliales et la formation d'un réseau primitif de structures vasculaires ; (2) l'angiogénèse, c'est-à-dire le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux à partir de capillaires préexistants. Le sang contient des angioblastes circulants également capables de contribuer à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

*m/s n° 12, vol. 16, décembre 2000*



**Figure 2. Angiogenèse in vivo et in vitro. A. Angiogenèse embryonnaire.** Au niveau du neuréctoderme d'un embryon de souris de 11,5 jours, un nouveau bourgeon capillaire (flèche) est en train de se former à partir du plexus capillaire péri-neural (noter la présence d'érythrocytes nucléés dans les vaisseaux primitifs). **B. Angiogenèse in vitro.** Un bourgeon capillaire s'est formé à l'intérieur d'une matrice tridimensionnelle de collagène sous l'influence du VEGF et du FGF basique. Les cellules endothéliales sont marquées par immunohistochimie avec un anticorps anti-cellule endothéliale (couleur jaune) et avec une contre-coloration de Bleu d'Evans (couleur rouge) (panneau B préparé avec l'assistance du Dr D. Baetens) (A et B : x 320).

Chez l'adulte, la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins s'observe physiologiquement lors du remodelage tissulaire cyclique dans le système génital féminin (dans l'ovaire avant l'ovulation et pendant la formation du corps jaune ; dans le placenta et la glande mammaire pen-

dant la gestation [5]), ou au cours de l'inflammation (aiguë et chronique) et lors des processus de réparation tissulaire (*Tableau I*). L'angiogénèse est également induite lors de l'ischémie tissulaire (cœur, membres, cerveau) et peut être observée dans la rétinopathie diabétique, l'arthrite

Tableau I	
ANGIOGENÈSE	
<b>Développement</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Système cardiovasculaire</li> <li>• Vascularisation des organes</li> </ul>	
<b>Physiologie</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cycle menstruel chez la femme (ovaire, utérus)</li> <li>• Grossesse : placenta et glande mammaire</li> <li>• Réparation tissulaire</li> <li>• Inflammation</li> <li>• Formation de vaisseaux collatéraux (cœur, extrémités, cerveau)</li> </ul>	
<b>Pathologie</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Croissance tumorale et métastase</li> <li>• Néovascularisation oculaire (rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire liée à l'âge)</li> <li>• Hémangiome</li> <li>• Polyarthrite rhumatoïde</li> </ul>	

Tableau II	
VAISSEAUX SANGUINS : MÉCANISMES DE FORMATION	
<b>Développement</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Différenciation d'angioblastes/hémangioblastes</li> <li>2. Différenciation de cellules endothéliales (plexus capillaire primaire)</li> <li>3. Bourgeonnement, régression</li> <li>4. Différenciation de péricytes et de cellules musculaires lisses</li> <li>5. Assemblage de la paroi vasculaire</li> <li>6. Différenciation organotypique des cellules endothéliales <ul style="list-style-type: none"> <li>• barrière hémato-encéphalique</li> <li>• endothélium fenêtré</li> <li>• veinules « à haut endothélium »</li> <li>• endothélium des sinusoïdes</li> </ul> </li> </ol>	
<b>Vie postnatale</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. « Désassemblage » de la paroi vasculaire</li> <li>2. Activation de cellules endothéliales (perméabilité, protéolyse, migration, mitose)</li> <li>3. Formation de tubules capillaires primitifs</li> <li>4. Différenciation de péricytes et de cellules musculaires lisses</li> <li>5. Assemblage de la paroi vasculaire</li> </ol>	

rhumatoïde, l'hémangiome juvénile et, en particulier, au cours de la croissance tumorale. L'intérêt scientifique et médiatique suscité par l'angiogenèse est dû en grande partie à la relation entre croissance

tumorale et néovascularisation. La progression tumorale débute par une phase prévasculaire, et, à partir d'une certaine taille de la tumeur, on observe une transition vers une phase vasculaire, transition appelée *angioge-*

*nic switch* (figure 3). Ce phénomène est néfaste pour l'organisme car il permet la croissance de la tumeur, la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases [6, 7]. Les cellules inflammatoires constituent un stimulus d'importance capitale pour la néovascularisation aussi bien lors de la réparation tissulaire qu'au cours la croissance tumorale [8].

Les tumeurs peuvent emprunter quatre voies de propagation : (1) l'invasion tissulaire locale ; (2) la voie lymphatique ; (3) la voie sanguine et (4) l'ensemencement direct des cavités ou des surfaces corporelles. Le moyen de dissémination initial le plus courant se fait par les vaisseaux lymphatiques. Dans le système lymphatique, on observe un processus analogue à l'angiogenèse, la lymphangiogenèse. La lymphangiogenèse est habituellement sous-estimée dans la dissémination tumorale par rapport à la dissémination vasculaire sanguine. Néanmoins, les observations cliniques et pathologiques indiquent que la colonisation des ganglions lymphatiques, que les cellules tumorales atteignent *via* les vaisseaux lymphatiques afférents, est un des premiers signes d'une dissémination métastatique. La contribution précise du système lymphatique à la néovascularisation tumorale et à la formation des métastases reste pour le moment un champ d'investigation très peu étudié. La découverte récente de marqueurs capables de distinguer l'endothélium des vaisseaux sanguins de celui des vaisseaux lymphatiques [9, 10] va très certainement accélérer les recherches dans ce domaine.

La vasculogenèse, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse sont des processus complexes dans lesquels de multiples fonctions cellulaires sont impliquées (Tableau II). Ces fonctions comprennent : (1) une activation, puis une réduction de la mobilité des cellules endothéliales, ce qui leur permet de migrer vers le stimulus angiogénique puis de s'arrêter dès qu'elles ont atteint leur destination ; (2) une prolifération cellulaire endothéliale réversible fournissant de nouvelles cellules pour la croissance et l'élongation du vaisseau, puis un retour à l'état quiescent dès que le vaisseau est formé ; (3) des interactions avec la

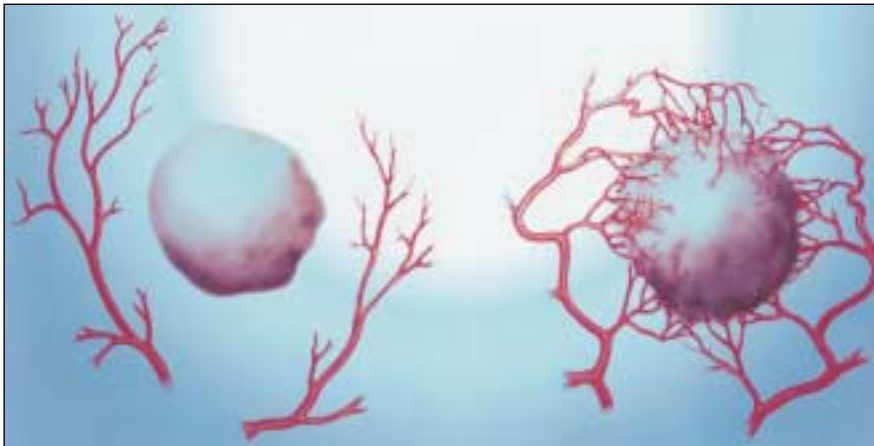


Figure 3. **Les phases prévasculaire et vasculaire de la tumorigenèse.** Une des caractéristiques de la tumorigenèse est la transition d'une phase prévasculaire (image à gauche) à une phase vasculaire (image à droite), c'est-à-dire l'induction de l'angiogenèse (ou angiogenic switch). Utilisée initialement dans le contexte de la progression tumorale, la notion d'angiogenic switch s'applique maintenant d'une façon plus générale pour expliquer la transition des cellules endothéliales de la phase de quiescence à la phase d'activation angiogénique. L'angiogenic switch concerne donc également l'angiogenèse embryonnaire, physiologique et pathologique. (Illustration préparée par M. Pierre-André Magnin, sur la base d'un dessin du Dr Judah Folkman publié dans [46].)

matrice extracellulaire environnante. Ces dernières impliquent la présence de protéines transmembranaires, en particulier les intégrines, qui mettent en connexion le cytosquelette avec les molécules de la matrice extracellulaire, ainsi que des protéases extracellulaires (et leurs inhibiteurs), responsables de la dégradation focale de la matrice extracellulaire lors de l'invasion cellulaire (*m/s* 1999, n° 1, p. 117 et n° 10, p. 1148).

Il n'est donc pas surprenant que des moyens de mesurer ces interactions et ces facteurs aient été développés, afin de mieux comprendre leurs rôles respectifs et de mettre en évidence de nouveaux médiateurs. Des modèles de culture de cellules endothéliales en trois dimensions [11], qui miment bien la configuration spatiale de la morphogenèse des vaisseaux *in vivo*, se sont révélés particulièrement précieux dans ce contexte (figure 2B).

Dans la vie adulte normale, les cellules endothéliales ont un taux de renouvellement très lent, l'arbre vasculaire étant en général quiescent. Le maintien de la quiescence endothéliale est probablement dû à la dominance de régulateurs endogènes négatifs. En

effet, dans les tissus adultes où il n'y a apparemment pas d'angiogenèse, on détecte aussi bien des régulateurs positifs que négatifs. Ces observations ont conduit à la notion citée précédemment d'*angiogenic switch*: dans l'endothélium activé (angiogénique), les régulateurs positifs prédominent, alors que la quiescence endothéliale est maintenue par une prédominance de régulateurs négatifs [12]. Ainsi, la notion d'*angiogenic switch* utilisée initialement dans un contexte de progression tumorale pour décrire le passage de la phase prévasculaire à la phase vasculaire, peut aussi s'appliquer à l'angiogenèse embryonnaire, physiologique et pathologique. Bien que cela reste à démontrer de façon définitive *in vivo*, l'angiogenèse serait donc due à l'induction d'un régulateur positif, ou à la perte d'un régulateur négatif, ou encore aux deux combinés.

La recherche de molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse a conduit à l'identification de plusieurs familles aux fonctions différentes, comprenant des facteurs de croissance polypeptidiques (cytokines), des molécules d'adhérence et des enzymes protéolytiques. Il est

important de souligner qu'un rôle dans la régulation endogène (*in vivo*) de l'angiogenèse n'a pu être démontré que pour un nombre très restreint de ces molécules, même si d'autres sont capables de stimuler ou d'inhiber l'angiogenèse dans divers modèles expérimentaux *in vitro*.

### Les facteurs angiogéniques

Les facteurs de croissance polypeptidiques, ou cytokines, modulant le comportement des cellules endothéliales (prolifération, différenciation, migration), de façon positive ou négative, sont produites par des cellules épithéliales ou conjonctives normales, ou par des cellules tumorales. Les cytokines peuvent être stockées dans la matrice extracellulaire. Leur effet sur les fonctions cellulaires s'observe à des concentrations picomolaires ou nanomolaires.

En se fondant sur l'observation qu'un environnement tissulaire spécifique peut influencer de manière décisive la réponse de ses composants cellulaires à une cytokine donnée, ces facteurs ont été considérés comme des éléments du langage de communication cellulaire, sur lequel le « contexte » exerce un contrôle [13]. Le contexte est déterminé par au moins quatre paramètres: (1) la présence et la concentration d'autres cytokines dans l'environnement péricellulaire de la cellule cible; (2) les interactions entre les cellules cibles, les cytokines et la matrice extracellulaire; (3) la configuration géométrique des cellules ainsi que l'organisation de leur cytosquelette; et (4) particulièrement pour les cellules endothéliales, les forces biomécaniques imposées par la circulation sanguine.

Parmi les cytokines impliquées dans la régulation positive de l'angiogenèse, les mieux étudiées appartiennent aux familles du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et du *fibroblast growth factor* (FGF). Alors que le rôle régulateur de VEGF dans l'angiogenèse au cours du développement – de même que dans l'angiogenèse physiologique et pathologique – est clairement établi [14-16] (*m/s* 1999, n° 1, p. 115), il n'en est pas de même pour les FGF. Les études géné-

tiques (y compris la délétion de gènes *FGF*) suggèrent qu'ils n'exercent aucun rôle durant le développement du système cardiovasculaire; en revanche, leur contribution dans l'angiogenèse inflammatoire et tumorale ne peut être complètement exclue [17, 18]. Trois autres familles de cytokines ont été impliquées dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, notamment pour l'assemblage de leur paroi et le maintien de l'intégrité vasculaire. Ces trois familles comprennent le *platelet-derived growth factor* (PDGF), en particulier le PDGF-BB [19], le *transforming growth factor-β* (TGF-β) [20] et les angiopoïétines [21]. Récemment, une quatrième famille a été identifiée, celle des éphrines, dont certains membres sont impliqués dans l'angiogenèse et dans la spécification des lits vasculaires artériels ou veineux [22]. Le VEGF et l'angiopoïétine sont les deux seuls représentants des facteurs angiogéniques connus qui soient capables d'agir sélectivement sur les cellules endothéliales.

Le VEGF se lie à deux récepteurs à activité tyrosine kinase exprimés par les cellules endothéliales et hémato-poïétiques: le récepteur de type 1 (*VEGF receptor-1* ou VEGFR-1) et le récepteur de type -2 (VEGFR-2). Après liaison avec le VEGF, le VEGFR-2 transmet des signaux mitogéniques, alors que le VEGFR-1 et le VEGFR-2 induisent des signaux migratoires. *In vitro*, le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales, la production d'enzymes protéolytiques extracellulaires et la formation de structures multicellulaires pourvues de lumières ressemblant à des capillaires sanguins (angiogenèse en culture). L'expression du VEGF est fortement augmentée dans plusieurs types cellulaires par l'hypoxie, un stimulus angiogénique de première importance. Le VEGF joue donc un rôle important dans les premières phases de l'angiogenèse [14, 15]. Il faut cependant souligner que le VEGF est nécessaire, mais probablement pas suffisant à lui seul, pour induire l'angiogenèse, et que la présence d'autres régulateurs positifs de l'angiogenèse, et/ou la perte de régulateurs négatifs, est requise pour le déclenchement d'une réponse néovasculaire complète. Par exemple, un effet de synergie entre VEGF et

FGF basique a été observé dans l'induction de l'angiogenèse *in vitro* [23].

La famille des VEGF, qui compte des membres nouveaux et récents, est impliquée non seulement dans l'angiogenèse, mais également dans la régulation de la lymphangiogenèse [24]. Ainsi, le VEGF-C, qui se lie aux VEGFR-2 et -3, est capable d'induire la formation de néovaisseaux de type vasculaire ou lymphatique, selon le contexte biologique. L'identification de médiateurs moléculaires de la lymphangiogenèse va certainement ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques contre la dissémination de cellules tumorales et la formation de métastases.

Les angiopoïétines représentent une famille de cytokines récemment identifiées, dont la connaissance a contribué de manière importante à la compréhension des mécanismes moléculaires qui règlent la maturation des vaisseaux sanguins au cours de l'angiogenèse [22]. L'angiopoïétine-1 (Ang1) est un agoniste du récepteur à activité tyrosine kinase Tie2, dont l'expression est restreinte aux cellules endothéliales et hémato-poïétiques. Au cours de l'embryogenèse, Ang1 est exprimée dans le mésoderme entourant les vaisseaux en voie de formation. L'étude génétique de la fonction de Ang1 chez la souris a montré son importance dans le remodelage du plexus vasculaire primitif, dans le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux et dans le recrutement de cellules périvasculaires. L'angiopoïétine-2 (Ang2), un deuxième ligand de Tie2, se lie avec une affinité semblable à celle de l'Ang1, mais inhibe la phosphorylation de Tie2 induite par Ang1. Ang2 est donc un antagoniste de Ang1. Sur la base de ces résultats, il a été proposé que Ang2 est un facteur pro-angiogénique qui, en antagonisant la fonction stabilisatrice de Ang1, rendrait l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à des facteurs angiogéniques comme le VEGF. Des travaux récents ont montré que le VEGF, le FGF basique et l'hypoxie induisent, dans les cellules endothéliales, l'expression de Ang2 [25]. Cela suggère: (1) qu'une augmentation de Ang2 pourrait représenter une composante importante de l'angiogenèse, indépendamment de

la nature du stimulus angiogénique, et (2) qu'une augmentation de l'expression d'Ang2 pourrait constituer une partie du mécanisme d'action des facteurs angiogéniques. L'induction de l'expression de Ang2, en inhibant le signal stabilisateur de Ang1, aurait pour but de faciliter le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux dans les premières phases d'activation de l'angiogenèse. En revanche, dans la phase de maturation des bourgeons vasculaires nouvellement formés, des facteurs stabilisateurs comme TGF-β pourraient diminuer, dans les cellules endothéliales, l'expression de Ang2, permettant ainsi le rétablissement du signal stabilisateur de Ang1.

La compréhension de l'activité intégrée (spatiale et temporelle) des cytokines est devenue un objectif primordial de la recherche actuelle sur l'angiogenèse. Les informations à ce sujet s'accumulent très rapidement. Ainsi, dans les conditions d'homéostasie normale, le renouvellement des cellules endothéliales chez l'homme adulte en bonne santé est très lent. Cela serait dû en partie à l'activation du TGF-β lors du contact entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires, étant donné que le TGF-β est un inhibiteur puissant de la mitose des cellules endothéliales [26]. Le TGF-β inhibe aussi la migration de ces cellules, il réduit l'expression de VEGFR-2 et stimule la synthèse d'intégrines et de composants de la matrice extracellulaire [20]. L'interaction des cellules périvasculaires avec les cellules endothéliales et le maintien des phénotypes péricyte ou cellule musculaire lisse se fait par l'intermédiaire d'Ang1, qui se lie au récepteur Tie2 situé sur les cellules endothéliales. On ne connaît pas encore les altérations qui surviennent au niveau de l'expression génique ou au niveau des médiateurs libérés par les cellules endothéliales en réponse à Ang1. Une des premières étapes de l'angiogenèse (phase d'activation) consiste en un détachement des cellules périvasculaires des cellules endothéliales, faisant suite à l'induction de Ang2 par l'hypoxie [27]. Cela inactive l'effet stabilisateur d'Ang1 et conduit au désassemblage de la paroi vasculaire, permettant ainsi aux cellules endothéliales de répondre aux signaux angiogéniques activateurs

[28]. Les cellules endothéliales activées dégradent ensuite leur lame basale sous-jacente à l'aide d'enzymes protéolytiques, et migrent dans le stroma environnant, formant des bourgeons vasculaires initialement dépourvus de lumière (cordons cellulaires) (figure 4). Dans un deuxième temps (phase de maturation), les cellules endothéliales de ces bourgeons cessent de proliférer et de migrer, forment une lumière, déposent une nouvelle lame basale, et recrutent des cellules périvasculaires. Un flux sanguin peut dès lors s'établir dans les vaisseaux néoformés. Ces événements sont la conséquence d'une diminution locale de l'expression/activité de VEGF et d'Ang2, probablement due à une augmentation de l'activité de TGF- $\beta$  [25], ou à la réduction de l'hypoxie, ce qui rétablit le signal de Ang1. Ang1, à l'inverse de Ang2, est exprimé de manière constitutive dans de nombreux organes et favorise le recrutement des cellules périvasculaires ainsi que la maturation des vaisseaux nouvellement formés. Le recrutement des cellules périvasculaires se fait aussi par l'intermédiaire de cytokines produites par les cellules endothéliales, comme le TGF- $\beta$  et le PDGF-BB. Le rôle précis des éphrines et de leurs récepteurs dans la formation et la morphogénèse vasculaire reste à établir. Les observations résumées ci-dessus annoncent une

période de recherche intense qui va certainement conduire à d'autres découvertes importantes pour la compréhension de la physiologie et de la pathologie de l'arbre vasculaire.

### Interactions cellule-matrice extracellulaire : la protéolyse et les intégrines

La matrice extracellulaire est un réseau complexe de macromolécules capable d'influencer profondément la fonction cellulaire et l'architecture tissulaire. Plusieurs processus biologiques, tels que la migration et la différenciation cellulaires, ainsi que la morphogénèse et le remodelage tissulaire, sont étroitement dépendants d'interactions avec la matrice extracellulaire. Parmi ces interactions, deux facteurs principaux semblent essentiels pour l'angiogenèse : l'adhérence cellules-matrice extracellulaire *via* les intégrines, et la protéolyse extracellulaire réalisée par les métalloprotéinases matricielles (*matrix metalloproteinases* ou MMP) et les activateurs du plasminogène [29-31]. Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques  $\alpha\beta$  capables de se lier aux composants de la matrice par leur domaine extracellulaire, et au cytosquelette par leur domaine cytoplas-

mique (*m/s* 1999, n° 5, p. 721). Au moins 15 sous-unités  $\alpha$  et 8 sous-unités  $\beta$  sont connues aujourd'hui. Les intégrines ne sont pas seulement impliquées dans l'adhérence cellulaire, mais peuvent également activer des voies de signalisation intracellulaire. Plusieurs intégrines sont exprimées par les cellules endothéliales. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est d'une importance particulière pour l'angiogenèse [32].  $\alpha_v\beta_3$  est capable de se lier aux protéines extracellulaires portant le tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD), qui existent dans la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène, la laminine, la thrombospondine, l'ostéopontine et le facteur de von Willebrand. *In vivo*,  $\alpha_v\beta_3$  est peu exprimée par les cellules au repos. En revanche, cette intégrine est induite au niveau des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse. Elle est également exprimée sur les cellules musculaires lisses lors de leur migration (resténose post-angioplastie, plaques d'athérosclérose). Bien que l'inactivation du gène de la sous-unité  $\alpha$ , soit sans conséquence apparente pour le système vasculaire embryonnaire [33], les antagonistes anti- $\alpha_v\beta_3$  (anticorps, peptides cycliques RGD) inhibent l'angiogenèse de la cicatrisation, de la néovascularisation rétinienne et de la croissance tumorale. La protéolyse extracellulaire est nécessaire pour l'angiogenèse car elle

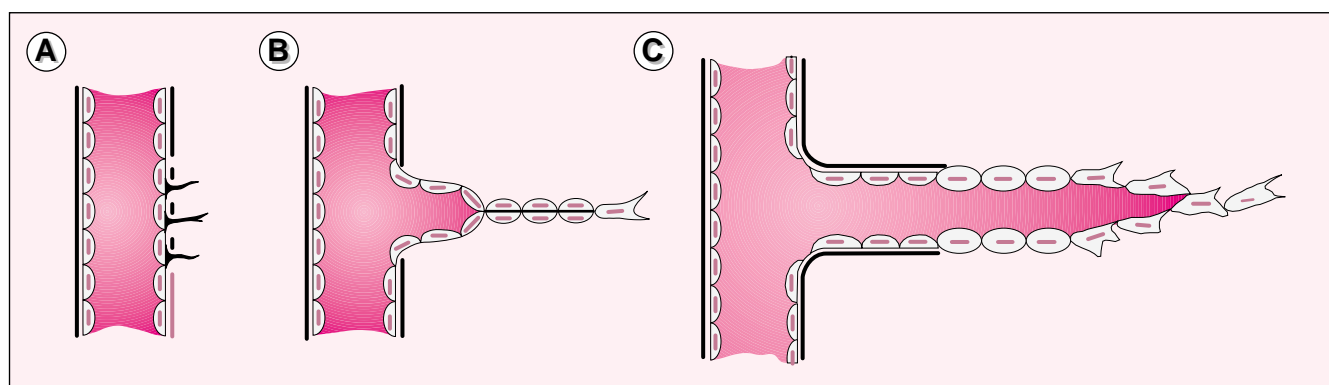


Figure 4. **Représentation schématique de l'angiogenèse.** **A.** Activation des cellules endothéliales suite à l'induction d'un régulateur positif (ou à la perte d'un régulateur négatif, ou aux deux). L'activation est suivie par la dégradation de la lame basale et par l'extension de fins processus cytoplasmiques en direction de la source du stimulus. **B.** Migration des cellules endothéliales dans la matrice et formation d'un bourgeon capillaire. Prolifération des cellules situées en arrière du front migratoire. Formation d'une lumière dans la région proximale du bourgeon capillaire. **C.** Maturation du bourgeon capillaire, impliquant la reconstitution de la lame basale. L'anastomose avec un bourgeon contigu va engendrer un réseau capillaire fonctionnel.

permet la dégradation de la lame basale sous-endothéliale, l'invasion de la matrice extracellulaire et la formation d'une lumière au sein d'un capillaire néoformé. La protéolyse extracellulaire est également impliquée dans la régulation de l'activité de certaines cytokines, soit en activant des formes latentes (par exemple TGF- $\beta$ ), soit en permettant le relargage des cytokines liées à la matrice extracellulaire (par exemple, FGF basique). Une autre conséquence de la protéolyse extracellulaire est la formation de fragments protéiques ayant eux-mêmes une activité biologique (par exemple, l'endostatine, formée à partir du collagène XVIII [34]).

La protéolyse extracellulaire est réalisée par les métalloprotéinases de la matrice (MMP), qui représentent une famille d'enzymes capables de dégrader la plupart des composants de la matrice [35], dont les collagénases, les gélatinases et les stromélysines font partie. Ces enzymes sont principalement sécrétées sous forme latente, mais il existe également des MMP transmembranaires appelées *membrane-type MMP* ou MT-MMP. L'existence d'inhibiteurs spécifiques (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP), de même que la sécrétion sous forme latente des MMP, constituent des éléments cruciaux de la régulation de l'activité des MMP. Compte tenu du rôle bien établi des MMP dans l'angiogenèse, la recherche d'inhibiteurs synthétiques de ces enzymes [36] est devenue un objectif prioritaire de l'industrie pharmaceutique, pour la thérapie anti-tumorale par exemple.

Une autre molécule impliquée dans la dégradation matricielle est le plasminogène, une pro-enzyme présente dans les liquides corporels [37]. Sa forme active, la plasmine, est impliquée principalement dans la fibrinolyse. La plasmine peut cependant dégrader d'autres composants de la matrice extracellulaire en activant certaines MMP. La transformation du plasminogène en plasmine se fait par l'intermédiaire des activateurs du plasminogène (*plasminogen activator*, PA). Ces derniers sont des sérine-protéases dont on connaît deux types : le type tissulaire (tPA) et le type urokinase (uPA). Des inhibiteurs spécifiques (*PA inhibitors*, PAI) et un récepteur cellulaire pour l'uPA (*uPA receptor*, uPAR)

représentent des facteurs importants de la régulation de l'activité des activateurs du plasminogène. uPAR est une protéine liée à la surface cellulaire par un domaine de glycosyl-phosphatidylinositol qui a pour fonction de délimiter la formation de plasmine à la surface cellulaire. Des études récentes ont montré que uPA, uPAR et PAI-1 jouent un rôle non seulement dans la dégradation matricielle, mais aussi dans l'adhérence cellulaire en interagissant avec la vitronectine et l'intégrine  $\alpha\beta_3$ . De façon surprenante, il semble que la fibrinolyse lors de l'angiogenèse soit effectuée par MT1-MMP et non pas par les activateurs du plasminogène [38].

### De la biologie cellulaire aux applications cliniques

Nous abordons actuellement un stade auquel, pour progresser dans la compréhension de la pathogénie des désordres vasculaires, une approche moléculaire et génétique des récepteurs à activité tyrosine kinase et de leurs ligands au niveau des cellules endothéliales est nécessaire. On s'attend, par exemple, à ce que des mutations ou des polymorphismes de ces récepteurs soient déterminants dans la pathogénie de malformations vasculaires, et dans le développement des maladies vasoprolifératives chroniques comme l'arthrite ou la rétinopathie. On peut aussi envisager

qu'une prédisposition ou une susceptibilité à certaines de ces affections résultent d'un état pro-angiogénique d'origine génétique qui conduirait à une expression augmentée des régulateurs positifs (facteurs et récepteurs angiogéniques), ou à une réduction de l'activité des inhibiteurs.

Concernant la pathogénie des malformations vasculaires, il a été démontré récemment qu'une mutation activant le récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 de la cellule endothéliale est associée à une forme autosomique dominante de malformation veineuse [39]. Un gène provoquant des anomalies veineuses cutanées héréditaires (les glomangiomes) a été localisé sur le chromosome 1p [40]. Par ailleurs, on sait que le syndrome de Klippel-Trenaunay-Weber est associé à une translocation chromosomique 5:11 [37], et qu'un locus candidat pour des malformations cavernueuses cérébrales est situé sur le chromosome 7q [42-44].

A l'heure actuelle, la compréhension des mécanismes de l'angiogenèse et de la formation de la paroi vasculaire ouvre des voies thérapeutiques prometteuses pour des avancées cliniques rapides dans la modulation positive ou négative de l'angiogenèse (*Tableau III*). La stimulation de l'angiogenèse (angiogenèse thérapeutique ou « pontage moléculaire ») est bénéfique dans le traitement de l'ischémie consécutive à une maladie

Tableau III

#### MODULATION DE L'ANGIOGENÈSE AU NIVEAU CLINIQUE

##### Stimulation de l'angiogenèse

- Induction de vaisseaux collatéraux :
  - ischémie du myocarde (occlusion des artères coronaires)
  - ischémie périphérique (occlusion des artères périphériques)
  - ischémie cérébrale (maladies cérébrovasculaires)
- Réparation tissulaire
- Chirurgie reconstructrice : lambeaux cutanés

##### Inhibition de l'angiogenèse

- Croissance tumorale
- Néovascularisation oculaire
- Hémangiome
- Arthrite rhumatoïde
- Néovascularisation des plaques d'athérosclérose
- Contraception ?

occlusive artérielle périphérique ou coronarienne. L'objectif thérapeutique de réduire l'hypoxie tissulaire dans les aires d'hypovascularisation est atteint par néoangiogenèse ou par recrutement de canaux vasculaires préexistants, principalement à partir des artérioles [45]. A l'inverse de l'angiogenèse thérapeutique, l'anti-angiogenèse est souhaitable dans le but de freiner la croissance tumorale et la formation de métastases. L'anti-angiogenèse semble également souhaitable dans l'hémangiome juvénile, l'arthrite rhumatoïde ou la rétinopathie proliférative. Considérant enfin le rôle de l'angiogenèse au niveau de l'ovaire et de l'utérus durant le cycle menstruel, ainsi que pendant l'implantation et pour le développement et la formation précoce du placenta, on peut aussi envisager des interventions pro ou anti-angiogéniques dans le contexte du contrôle de la fertilité. Les recherches de thérapie génique et de pharmacologie doivent être poursuivies pour affiner le contrôle de l'angiogenèse et perfectionner les stratégies thérapeutiques. L'activité actuelle de la recherche dans le champ de l'angiogenèse et de la morphogenèse vasculaire indique que nombre d'objectifs développés dans cet article pourraient rapidement être atteints ■

#### Remerciements

J'aimerais remercier Roberto Montesano, Stefano Mandriota, Mylène Amherdt et Alain Perrelet pour leur aide dans la préparation de ce manuscrit. J'aimerais également remercier M. Pierre-André Magnin pour la préparation de la figure 3. Les travaux provenant de notre laboratoire ont été soutenus par le Fonds national suisse de recherche scientifique, l'État de Genève, et diverses fondations privées.

#### RÉFÉRENCES

- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-4.
- Dieterlen-Lievre F, Jaffredo T, Pardanaud L. Emergence of the endothelial network during embryonic development. *Pathol Biol (Paris)* 1999; 47: 301-6.
- Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 1999; 103: 1231-6.
- Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ, et al. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation and involution. *Dev Dyn* 2000; 218: 507-24.
- Folkman J. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-63.
- Pepper MS. Manipulating angiogenesis: from basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 605-19.
- Coussens LM, Raymond WW, Bergers G, et al. Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev* 1999; 13: 1382-97.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 1999; 144: 789-801.
- Wigle JT, Oliver G. *Prox1* function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-78.
- Montesano R, Pepper MS. Three-dimensional *in vitro* assay of endothelial cell invasion and capillary tube morphogenesis. In: Little CD, Mironov V, Sage H, eds. *Vascular morphogenesis: in vivo, in vitro, in mente*. Cambridge, MA: Birkhäuser Boston, 1998: 79-110.
- Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86: 353-64.
- Nathan C, Sporn M. Cytokines in context. *J Cell Biol* 1991; 113: 981-6.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 97-132.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 1-30.
- Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10: 528-35.
- Pepper MS, Mandriota SJ, Vassalli JD, Orci L, Montesano R. Angiogenesis regulating cytokines: activities and interactions. Attempts to understand metastasis formation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213: 31-67.
- Christofori G. The role of fibroblast growth factors in tumour progression and angiogenesis. In: Bicknell R, Lewis CE, Ferrara N, eds. *Tumour angiogenesis*. New York: Oxford University Press, 1997: 201-37.
- Lindahl P, Hellström M, Kalén M, Betsholz C. Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol* 1998; 9: 407-11.
- Pepper MS. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Res* 1997; 8: 21-43.
- Davis S, Yancopoulos GD. The angiopoietins: yin and yang in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237: 173-85.
- Gale NW, Yancopoulos GD. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 1999; 13: 1055-66.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 824-31.
- Veikkola T, Alitalo K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 211-20.
- Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res* 1998; 83: 852-9.
- Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 1999; 103: 157-8.
- Mandriota SJ, Pyke C, Di Sanza C, Quinodoz P, Pittet B, Pepper MS. Hypoxia-inducible angiopoietin-2 expression is mimicked by diphenylene iodonium and occurs in the rat brain and skin in response to systemic hypoxia and tissue ischemia. *Am J Pathol* 2000; 156: 2077-89.
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277: 48-50.
- Hynes RO, Bader BL. Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. *Thromb Haemost* 1997; 78: 83-7.
- Carmeliet P, Collen D. Development and disease in proteinase-deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res* 1998; 91: 255-85.
- Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. *J Clin Invest* 1999; 103: 1237-41.



## RÉFÉRENCES

32. Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alpha v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103: 1227-30.
33. Bader BL, Rayburn H, Crowley D, Hynes RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 1998; 95: 507-19.
34. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
35. Nagase H, Woessner FJ. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
36. Koivunen E, Arap W, Valtanen H, et al. Tumor targeting with a selective gelatinase inhibitor. *Nat Biotechnol* 1999; 17: 768-74.
37. Pepper MS, Montesano R, Mandriota SJ, Orci L, Vassalli JD. Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis. *Enzyme Protein* 1996; 49: 138-62.
38. Hiraoka N, Allen E, Apel IJ, Gyetko MR, Weiss SJ. Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins. *Cell* 1998; 95: 365-77.
39. Vikkula M, Boon LM, Carraway KL, et al. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase TIE2. *Cell* 1996; 87: 1181-90.
40. Boon LM, Brouillard P, Irrthum A, et al. A gene for inherited cutaneous venous anomalies («glomangiomas») localizes to chromosome 1p21-22. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 125-33.
41. Whelan AJ, Watson MS, Porter FD, Steiner RD. Klippel-Trenaunay-Weber syndrome associated with a 5:11 balanced translocation. *Am J Med Genet* 1995; 59: 492-94.
42. Dubovsky J, Zabramski JM, Kurth J, et al. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 453-8.
43. Gunel M, Awad IA, Anson J, Lifton RP. Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 92: 6620-4.
44. Marchuk DA, Gallione CJ, Morrison LA, et al. A locus for cerebral cavernous malformations maps to chromosome 7q in two families. *Genomics* 1995; 28: 311-4.
45. Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 835-7.
46. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1974; 19: 331-58.

## Summary

### Vascular angiogenesis and morphogenesis of the vascular tree : from cell biology to clinical findings

Angiogenesis is a necessary requirement for the growth of normal and neoplastic tissues. Immature endothelial-lined tubes which arise during angiogenesis differentiate into capillaries or larger vessels such as arteries and veins. Interest in these processes has gained impetus recently with the identification of novel mediators and their associated receptor tyrosine kinases. The early phase of angiogenesis includes endothelial cell migration, proliferation and extracellular proteolysis, and is mediated in part by the vascular endothelial growth factor (VEGF) family. Reciprocal interactions then occur between pluripotent mesenchyma and endothelium, resulting in the differentiation of pericytes and smooth muscle cells. These interactions are mediated by the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), platelet-derived growth factor (PDGF) and angiotensin families. Fibroblast growth factors (FGF) have long been implicated in the regulation of angiogenesis. Although a large body of evidence gained principally from gene deletion studies questions their role during development, a role during inflammatory and tumor angiogenesis cannot be excluded. A novel role in angiogenesis as well as specification of arterial and venous vascular segments has recently been attributed to certain members of the Ephrin family. Advances in our understanding of the mechanisms of angiogenesis, together with the accumulation of information on processes as diverse as postnatal growth, wound healing and tissue repair, tumorigenesis, diabetic retinopathy, fertility/sterility and vascular malformations, has provided new hope for novel therapeutic strategies.

## TIRÉS À PART

M. S. Pepper.