médecine/sciences 1998 ; 14 : 437-47

La morphogenèse de l'arbre vasculaire

De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques

Virginie Mattot
Albin Pourtier
Fabrice Soncin
Bernard Vandenbunder

La morphogenèse de l'arbre vasculaire commence par la formation massive des ébauches de capillaires, suivie du développement et de la maturation de certaines branches et la régression des autres. C'est l'observation directe et la manipulation de modèles *in vivo*, et récemment une série d'expériences de recombinaison homologue, qui ont permis de décrire les mécanismes qui contrôlent ces processus et d'identifier des facteurs qui participent à la formation d'un capillaire mûr, entouré d'une lame basale et de péricytes. De nouveaux inhibiteurs ont été purifiés en étudiant des situations où l'angiogenèse est naturellement bloquée. Ces molécules sont capables non seulement d'empêcher la croissance tumorale, mais aussi de provoquer la régression de tumeurs établies en bloquant leur irrigation. Chez la souris, il est possible d'éviter le réveil de ces tumeurs par une chimiothérapie conventionnelle ou par plusieurs cycles de traitement anti-angiogénique, puisque les cellules endothéliales ne développent pas de résistance aux inhibiteurs de l'angiogenèse.

ADRESSES

V. Mattot : *docteur ès sciences de l'université de Lille.* Center for molecular and vascular biology, campus Gasthuisberg, KU Leuven, 3000 Louvain, Belgique. A. Pourtier : *chercheur postdoctoral du CHRU de Lille.* F. Soncin : *chargé de recherches à l'Inserm.* B. Vandenbunder : *directeur de recherches au Cnrs, directeur de l'équipe postulante 560 du Cnrs-Institut Pasteur de Lille.* Régulation des processus invasifs, de l'angiogenèse et de l'apoptose, Institut de biologie de Lille, 1, rue du Professeur-Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.

TIRÉS À PART

B. Vandenbunder.

Il y a quelques années, l'étude des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse se limitait aux premières étapes du bourgeonnement d'un capillaire à partir d'un vaisseau préexistant : la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration, la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes. Des expériences *in vivo* ont permis d'explorer plus avant la morphogenèse de l'arbre vasculaire et de proposer, avec une étude parallèle de modèles *in vitro*, les mécanismes moléculaires qui la contrôlent. De nouvelles activités ont ainsi été mises en évidence pour les facteurs qui avaient été purifiés grâce à leur capa-

cité de contrôler la prolifération ou la morphogenèse des cellules endothéliales *in vitro*. Des nouveaux facteurs ont été identifiés qui participent à des étapes plus tardives du développement vasculaire en « stabilisant » les interactions entre les cellules endothéliales et la matrice extracellulaire ou les péricytes.

La morphogenèse de l'arbre vasculaire : du bourgeonnement à l'élagage

L'étude du développement embryonnaire a permis de distinguer deux mécanismes différents qui président à la formation des vaisseaux sanguins : la vasculogenèse, qui consiste en la différenciation *in situ* des précurseurs des cellules endothéliales et leur association pour former sur place les premiers vaisseaux sanguins, et l'angiogenèse qui correspond à l'extension de l'arbre vasculaire à partir des vaisseaux préexistants [1, 2]. Les cellules endothéliales stimulées à l'endroit où va bourgeonner le futur vaisseau sanguin migrent, prolifèrent et s'organisent pour former la paroi vasculaire. Cependant, dans l'embryon, les précurseurs des cellules endothéliales ou angioblastes sont aussi capables de migrer sur de grandes distances et de participer à la formation de capillaires éloignés de l'endroit où ils se sont différenciés [3].

Chez l'adulte, des angioblastes circulant dans le sang periphérique, capables de se différencier en cellules endothéliales *in vitro*, et de contribuer à l'angiogenèse *in vivo* [4], ont été récemment isolés. Ces cellules ont été isolées à l'aide de billes magnétiques recouvertes d'anticorps dirigés contre CD34 ou Flk-1 (VEGFR-2, *vascular endothelial growth factor receptor-2*). Elles forment des structures ressemblant à des capillaires sur la fibronectine ou le collagène *in vitro*. Elles sont capables de s'intégrer *in vivo* dans les parois des vaisseaux aux sites d'angiogenèse et de constituer jusqu'à 50 % de la population endothéliale dans les vaisseaux qui irriguent des tumeurs ou dans les vaisseaux collatéraux qui se développent après une ischémie sévère provoquée dans la patte de souris ou de lapin. Ces angioblastes sont issus de la moelle osseuse et leur nombre dans la circulation augmente après administration de GM-CSF *(granulocyte-macrophage colony stimulating factor)* (Jeffrey Isner, communication personnelle). Ils pourraient servir de vecteur dans des protocoles de thérapie génique.

Le remodelage de l'arbre vasculaire

La progression de la néovascularisation a été décrite précisément *in vivo*, il y a une soixantaine d'années, à l'aide de chambres constituées de deux lamelles de mica séparées de 40 à 60 µm, installées dans l'oreille de lapin [5]. Sept jours après l'implantation de la chambre, de nouveaux capillaires se forment par un bourgeonnement massif et établissent entre eux de nombreuses connexions *(figure 1)*. Par la suite, le réseau de

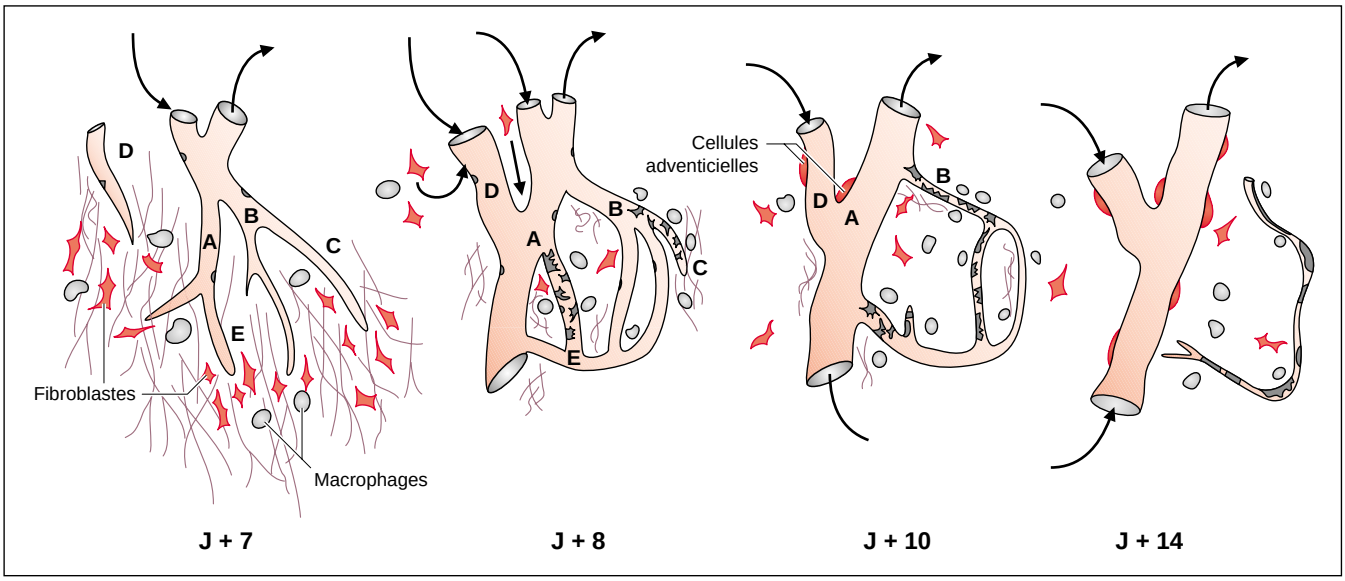

Figure 1. ***Le remodelage de l'arbre vasculaire au cours de l'angiogenèse.*** *(D'après [5].) La formation des néovaisseaux, telle qu'elle est observée dans une chambre implantée dans l'oreille de lapin (au jour J0), commence par un bourgeonnement massif à partir des vaisseaux préexistants, suivi de séquences de remodelage. (J + 7). En amont des zones de progression, dans le réseau de fibrine qui s'est formé, se trouvent des macrophages et des fibroblastes. Le flux sanguin principal (flèche) ne parcourt pas encore les nouveaux branchements (A, B, C, D et E). (J + 8). Les branchements A et D ainsi que B et E ont fusionné. Le flux sanguin est plus intense dans A, B et D que dans E. Les cellules endothéliales font saillie dans la lumière des dérivations E et C, et leurs noyaux présentent un aspect condensé. La composition de la matrice extracellulaire change. (J + 10). Les dérivations C et E ont disparu. La régression s'étend à toute la dérivation B dans laquelle le flux sanguin est bloqué ; des macrophages sont présents autour de cette dérivation. Le flux sanguin s'établit dans un axe vasculaire principal dont les parois se renforcent par des cellules adventicielles issues de la différenciation de « fibroblastes recrutés ». (J + 14). L'axe principal a mûri aux dépens de ses ramifications dont certains reliquats sont encore présents.*

« fibrine » qui avait envahi la chambre est remplacé par un gel semi-solide limitant le mouvement des cellules extravasculaires. Des « fibroblastes » recrutés par les capillaires viennent ensuite se différencier au contact de leurs parois et renforcer celles-ci. Ces « fibroblastes adventiciels » sont impliqués dans la production de collagène de type I de la matrice extracellulaire [6] ; ils correspondent vraisemblablement à des péricytes ou à des cellules de muscle lisse.

Enfin, la structure de la paroi des vaisseaux s'adapte au débit et à la pression du flux sanguin. Lorsque celui-ci est plus élevé, la structure des nouveaux vaisseaux se stabilise, tandis que les vaisseaux non retenus dans la progression de l'arbre vasculaire rétrécissent et régressent rapidement, notamment dans les zones recevant un flux sanguin réduit *(figure 1)*. Des cellules endothéliales, caractérisées par un noyau irrégulier et condensé, font saillie dans la lumière de ces vaisseaux [5]. La diminution du flux sanguin ou de la quantité d'oxygène peut effectivement induire l'apoptose des cellules endothéliales *in vitro* [7]. Dans la membrane pupillaire, l'observation directe chez des rats nouveau-nés suggère que les macrophages peuvent aussi déclencher la régression de la vascularisation [8]. Le blocage du débit sanguin entraîne ensuite une cascade d'apoptoses secondaires et l'atrophie du vaisseau. L'architecture de l'arbre vasculaire est donc modelée et stabilisée par le débit sanguin, par les interactions entre les cellules endothéliales, les péricytes, les cellules de muscle lisse et la matrice extracellulaire.

Les différences morphologiques des vaisseaux qui irriguent les tumeurs

Les vaisseaux qui irriguent les tumeurs présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes de celles de vaisseaux normaux *(figure 2)*. La membrane basale qui les entoure est interrompue ou absente et les cellules endothéliales sont parfois manquantes. Il en résulte une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'extravasation d'hématies. La vascularisation au sein des tumeurs solides présente des ramifications tortueuses qui rappellent la morphologie des capillaires aux étapes précoces de l'angiogenèse physiologique, lorsque l'orientation et la sélection des troncs vasculaires définitifs n'a pas encore été réalisée. Le réseau vasculaire qui irrigue les tumeurs oppose bien souvent une résistance importante au flux sanguin et assure une perfusion inadéquate en raison de l'absence de structure hiérarchisée, de la présence de *shunts* artério-veineux et d'extrémités aveugles, de circonvolutions des vaisseaux et d'irrégularité de leurs contours, de l'adhérence des lymphocytes aux parois et de l'agrégation des plaquettes [9].

Il est vraisemblable que les caractéristiques morphologiques des vaisseaux qui irriguent les tumeurs sont le résultat du micro-environnement spécifique dans lequel ils se sont développés, notamment de l'absence de péricytes, qui empêche le remodelage et l'élagage de l'arbre vasculaire.

Des nouvelles activités pour les facteurs angiogéniques connus

On connaît aujourd'hui une vingtaine de facteurs angiogéniques (pour revue, *voir* [10]). La comparaison de l'expression de sept de ces facteurs dans des cancers du sein et deux études de cancers du côlon montrent que c'est l'expression du *platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD-ECGF) qui est corrélée à la densité vasculaire [11]. Ce facteur est identique à la thymidine phosphorylase [12]. Le 2-désoxy-D-ribose, un des produits de la voie métabolique dans laquelle intervient cette

Figure 2. ***Morphologie des capillaires irriguant la peau (A) et un muscle squelettique (B), des sinusoïdes dans une xénogreffe d'un sarcome humain (C) et des vaisseaux dans une isogreffe de sarcome DS de rat (D)***. *Sur le cliché A, les flèches indiquent l'empreinte des noyaux des cellules endothéliales et la tête de flèche une limite entre deux de ces cellules (avec l'aimable autorisation de M.A. Konerding, Université de Mayence, Allemagne).*

enzyme, a une activité angiogénique sur la membrane chorio-allantoïde de poulet [13]; il pourrait être responsable de l'activité biologique du PD-ECGF. Il est intéressant de noter que d'autres facteurs qui stimulent la motilité cellulaire ont aussi une activité enzymatique essentielle pour leur activité biologique: c'est le cas du *tumor cell autocrine motility factor* (AMF) avec son activité phosphohexose isomérase, de l'autotaxine (ATX) avec son activité phosphodiestérase/nucléotide pyrophosphatase.

Plus de 200 publications rapportent l'expression du VEGF *(vascular endothelial growth factor)* et de ses récepteurs au voisinage de néovaisseaux pathologiques. Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales et leur migration. Il induit aussi la migration des macrophages [14] par l'intermédiaire de l'un de ses récepteurs Flt-1 (VEGFR-1, *vascular endothelial growth factor receptor-1*). En stimulant la perméabilité des capillaires, il induit l'extravasation du fibrinogène, de la fibronectine ou de la vitronectine qui vont modifier la composition de la matrice extracellulaire et faciliter l'angiogenèse [15, 16]. L'activité du VEGF s'étend au-delà de l'étape de bourgeonnement des capillaires puisqu'une stimulation constante par le VEGF semble nécessaire pour stabiliser les vaisseaux nouvellement formés. Lorsque des rats nouveau-nés sont soumis à des conditions d'hyperoxie, l'apoptose des cellules endothéliales et la régression des capillaires est précédée par l'extinction de l'expression du VEGF par les cellules gliales de la rétine. Cette régression est empêchée par l'injection de VEGF dans l'œil, ce qui suggère que le VEGF est un facteur de survie pour les cellules endothéliales [17]. L'observation directe de la vascularisation d'une tumeur à travers une fenêtre transparente a permis de montrer que l'injection d'un anticorps neutralisant l'activité du VEGF diminue la perméabilité vasculaire et modifie la morphologie des vaisseaux sanguins, qui deviennent plus étroits et moins tortueux avant de régresser [18].

Chez l'adulte, le VEGF et son récepteur ont été détectés dans les glomérules du rein et dans le plexus choroïde et leur expression n'est pas associée à la prolifération endothéliale; l'urine, la salive, le lait et les larmes contiennent des quantités significatives de VEGF. Dans ces tissus, il pourrait jouer un rôle dans la différenciation, notamment dans la fenestration de l'endothélium (Werner Risau, communication personnelle).

Le VEGF est le membre fondateur d'une famille de facteurs qui comprend le VEGF-B, le VEGF-C et le *placenta growth factor* (PlGF) qui ont été isolés récemment. Le VEGF-B stimule la prolifération des cellules endothéliales tandis que le VEGF-C participe à la formation des vaisseaux lymphatiques. Le PlGF, qui forme des hétérodimères avec le VEGF, a aussi des activités chimiotactiques, mitogènes et angiogéniques, mais son expression semble restreinte au placenta.

Une nouvelle génération de facteurs qui participent à l'angiogenèse

La technique de recombinaison homologue a permis de mettre en évidence le rôle essentiel que jouent des facteurs angiogéniques connus, leurs récepteurs, des molécules d'adhérence ou des facteurs de transcription à différentes étapes de la morphogenèse de l'arbre vasculaire chez l'embryon *(Tableau I)*. Cette technique a aussi permis de révéler une nouvelle activité pour des facteurs étudiés dans un autre domaine. Ainsi lorsque le gène codant le facteur tissulaire (TF) est inactivé, le plexus vasculaire dans l'aire extra-embryonnaire est anormal, le nombre de cellules interstitielles faible et les embryons meurent vers E 9,5; le rôle du facteur tissulaire dans la vasculogenèse semble indépendant de son activité dans la coagulation puisque l'absence de facteur VII ne perturbe pas le développement embryonnaire *(Tableau I)*.

L'angiopoïétine-1

La recombinaison homologue a aussi apporté des informations importantes dans l'étude de nouveaux facteurs, comme les ligands de Tie-2 (Tek). Le gène codant pour Tie-2, tout comme les gènes codant pour Flt-1, Flk-1 et Tie-1 (Tie), a été découvert à l'aide d'expériences de PCR *(polymerase chain reaction)*, avec des oligonucléotides correspondant à des séquences conservées dans les récepteurs à activité tyrosine-kinase. L'expression de ce gène a été détectée dans les îlots sanguins du sac vitellin, là où se trouvent les précurseurs communs aux cellules endothéliales et aux premiers érythroblastes [19]. Elle est ensuite observée dans l'endocarde et dans les cellules endothéliales, aussi bien à l'intérieur de l'embryon que dans les annexes extra-embryonnaires. Cette expression persiste chez l'adulte à un niveau plus faible, alors que les cellules endothéliales ne prolifèrent plus. Les embryons *Tie-2*$^{-/-}$ ne dépassent pas le stade E 10,5 [20]; ils présentent un développement limité de leur système vasculaire, surtout au niveau de la tête et du cœur. A l'intérieur de l'embryon et dans le sac vitellin, les vaisseaux sont dilatés. Leur taille est homogène: on ne distingue pas de gros et petits vaisseaux. Les capillaires ne bourgeonnent pas dans le neurectoderme.

Alors que très rapidement Flt-1 et Flk-1 ont été identifiés comme des récepteurs à forte affinité pour le VEGF, Tie-2 est resté un récepteur orphelin pendant plusieurs années. Le gène codant pour l'angiopoïétine-1 *(Ang-1)*, premier ligand de Tie-2, a été identifié dans une banque d'expression. Une molécule de récepteur Tie-2 marquée a permis de repérer les cellules exprimant ce ligand dans une population de cellules COS transfectées [21]. Le facteur Ang-1 induit la phosphorylation de Tie-2 en se fixant à la surface des cellules endothéliales, mais il n'induit pas leur prolifération, ni la formation de pseudocapillaires dans des gels de collagène. Cependant son expression à proximité des vaisseaux sanguins en formation et le phénotype des embryons *Ang-1*$^{-/-}$ suggèrent qu'il est impliqué dans l'angiogenèse. Ces embryons ne dépassent pas le stade E 12; à ce stade, la complexité du réseau vasculaire est réduite alors que le nombre total de cellules endothéliales n'est pas affecté. Les vaisseaux ont une taille relativement homogène et ils forment un genre de syncytium. Ce phénotype est particulièrement visible dans le sac vitellin qui reste constitué d'un réseau de petits capillaires et ne présente pas de gros vaisseaux, contraire-

Tableau I

PHÉNOTYPES RÉSULTANT DU *KNOCK-OUT* DE QUELQUES ACTEURS MOLÉCULAIRES ASSOCIÉS À L'ANGIOGENÈSE

Facteurs	Fonctions	Génotype	Létalité	Phénotype lié à l'angiogenèse
VEGFR-1	Récepteur du VEGF	–/–	E8,5-9,5	Cellules endothéliales présentes. Le réseau vasculaire est perturbé : vaisseaux fusionnés et désorganisés
VEGFR-2	Récepteur du VEGF	–/–	E8,5-9,5	Les îlots sanguins sont absents. Pas de cellules endothéliales différenciées, pas de vaisseaux sanguins organisés dans l'embryon ou le sac vitellin
VCAM-1	Ligand transmembranaire de α4β1 et α4β7	–/–	E9,5-11,5	La placentation est anormale, du fait d'un défaut de fusion du chorion avec l'allantoïde
Tissue Factor	Récepteur du facteur VII/VIIa	–/–	E9,5-11,5	Les vaisseaux vitellins sont anormaux, les capillaires fusionnés. Peu de cellules musculaires lisses et de péricytes
Intégrine α5	Récepteur d'adhérence cellulaire	–/–	E10-11	Défaut d'accolement du mésoderme avec l'endoderme dans le sac vitellin qui provoque un défaut partiel de vasculogenèse.
TGF β-1	Facteur de croissance et de différenciation	–/–	E1,5 dans 50 % des cas	Défauts de vasculogenèse et d'hématopoïèse essentiellement dans le sac vitellin. Les cellules endothéliales sont présentes mais les capillaires sont peu différenciés. Contacts cellulaires affectés
TGFβR-II	Récepteur du TGFβ	–/–	E10,5	Défaut de vasculogenèse et d'hématopoïèse dans le sac vitellin
Tie2 (Tek)	Récepteur de l'angiopoïétine-1 et -2	–/–	E10,5	Le réseau vasculaire est peu hiérarchisé, avec une absence de branchements secondaires. Dilatation des vaisseaux
G-α 13	Protéine G	–/–	E10,5	Pas de vaisseaux dans le sac vitellin. Les cellules endothéliales sont présentes mais non organisées en capillaires. Les vaisseaux de l'embryon sont élargis avec un endothélium parfois absent
P120 RasGAP	Régulateur négatif de Ras	–/–	E10,5	Le réseau vasculaire du sac vitellin est peu hiérarchisé. Les vaisseaux de l'embryon sont localement rompus
ARNT	Facteur de transcription, acteur de la réponse à l'hypoxie	–/–	E10,5	Défaut d'angiogenèse dans le sac vitellin et arcs branchiaux, après une vasculogenèse normale
TEL	Protéine nucléaire de la famille Ets	–/–	E10,5-11,5	Régression des vaisseaux primordiaux du sac vitellin après une vasculogenèse normale

Tableau I (suite)				
Facteurs	**Fonctions**	**Génotype**	**Létalité**	**Phénotype lié à l'angiogenèse**
VEGF	Facteur de croissance et de différenciation	+/–	E11-12	Défaut d'angiogenèse dans le sac vitellin, le placenta et tout l'embryon
Angiopoïétine-1	Ligand de Tie-2	–/–	E11-12,5	Le réseau vasculaire est peu hiérarchisé. Il n'y a pas de cellules périendothéliales mais l'endothélium est normal
LKLF	Facteur de transcription	–/–	E12,5-14,5	Hémorragies ; réduction du nombre de péricytes et de cellules musculaires lisses, matrice extracellulaire réduite
PDGF-B	Facteur de croissance	–/–	naissance	Hémorragies ; absence de péricytes associés aux capillaires
Tie-1	Récepteur orphelin	–/–	naissance	Œdèmes et hémorragies. Les cellules endothéliales sont anormalement « perméables »
Facteur VII	Facteur de coagulation	–/–	naissance	Hémorragies ; la structure des vaisseaux est normale
Collagène III	Composant de la matrice extracellulaire	–/–	Adulte	Réduction du nombre de fibrilles de collagène dans la paroi des vaisseaux. Rupture des gros vaisseaux
tPA	Activateur du plasminogène	–/–	non	Aucun
uPA	Activateur du plasminogène	–/–	non	Aucun
PAI-1	Inhibiteur de l'uPA	–/–	non	Aucun

Les références afférentes à ce tableau sont à la disposition des lecteurs qui les demanderont en s'adressant au laboratoire ou à vdbunder@infobiogen.fr. Les différents niveaux de trame pour chaque ligne correspondent aux différentes classes de molécules étudiées ; la trame grise devient de plus en plus foncée en allant de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule.

ment à l'embryon normal. L'analyse ultrastructurale des embryons *Ang-1*$^{-/-}$ montre un défaut d'étalement et d'apposition des cellules endothéliales sur la matrice sous-jacente ainsi qu'un déficit de cellules péri-endothéliales dans les zones de bourgeonnement de nouveaux vaisseaux [22]. Ce phénotype, très proche du phénotype des embryons *Tie-2*$^{-/-}$, suggère un rôle du couple angiopoïétine-1/Tie-2 dans la stabilisation des interactions des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire et les péricytes pendant la mise en place des vaisseaux sanguins.

L'angiopoïétine-2

C'est en recherchant des gènes homologues de *Ang-1* qu'a été identifié le gène codant pour l'angiopoïétine-2 *(Ang-2)*, par hybridation d'une banque d'ADNc avec une sonde Ang-1 [23]. Les séquences en acides aminés de Ang-2 et Ang-1 présentent 85 % d'identité. Comme Ang-1, Ang-2 est un ligand pour le récepteur Tie-2, mais non pour Tie-1. Dans les cellules endothéliales, Ang-2 bloque la phosphorylation de Tie-2 induite par Ang-1 ; elle se comporte donc comme un antagoniste de Ang-1. L'expression des transcrits codant pour Ang-2 dans les cellules endothéliales ou les péricytes des vaisseaux de l'embryon se superpose en partie à l'expression des transcrits *Ang-1*, ce qui suggère que Ang-2 pourrait contrôler l'activité de Ang-1 dans certains sites et à certains stades du développement vasculaire. Chez l'adulte, alors que les transcrits *Ang-1* s'expriment dans de nombreux tissus, les transcrits *Ang-2* sont détectés dans des tissus où se produit une angiogenèse importante, dans l'ovaire, l'utérus et le placenta. Dans l'ovaire, l'expression de *Ang-2*, comme celle du VEGF, précède puis accompagne l'expression de *Ang-1* et la formation des vaisseaux ; lorsque ces vaisseaux régressent, les transcrits *Ang-2* s'accumulent. L'expression de *Ang-2*, ciblée dans les cellules endothéliales par transgenèse avec le promoteur de Tie-2, induit des défauts vasculaires identiques ou parfois plus sévères que ceux qui sont observés chez les souris *Tie-2*$^{-/-}$ ou *Ang-1*$^{-/-}$. Ces résultats suggèrent que Ang-2 est un antagoniste naturel de Ang-1. Ang-2 coopérerait avec le VEGF pour

induire l'angiogenèse en empêchant qu'Ang-1 maintienne l'intégrité de l'endothélium et sa quiescence *(figure 3)*. En revanche, en l'absence de VEGF, l'inhibition de l'activité de *Ang-1* par Ang-2 conduirait à un détachement des cellules endothéliales de la matrice et des péricytes, à leur mort et à la régression des vaisseaux.

Les molécules d'adhérence au cours de l'angiogenèse

L'activité des facteurs angiogéniques dépend du contexte dans lequel ils agissent, des forces de cisaillement qui s'exercent sur les cellules, des autres facteurs présents et des composants de la matrice extracellulaire [24]. Les signaux en provenance de cette matrice sont en grande partie relayés par les intégrines, constituées de deux sous-unités, α et β. L'expression de ces sous-unités est rarement spécifique d'un tissu, et une dizaine d'entre elles ont été détectées dans les cellules endothéliales [25]. Ainsi l'inactivation du gène codant pour α5 provoque de nombreux défauts dans les vaisseaux sanguins du sac vitellin, mais aussi dans tous les autres tissus dérivés du mésoderme, et les embryons homozygotes meurent entre E10 et E11 *(Tableau I)*.

L'intégrine αvβ3 est un récepteur pour la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène, la laminine, le facteur de von Willebrand, le collagène ou la thrombospondine. Sa synthèse peut être induite par le FGF-2 *(fibroblast growth factor-2)* dans des cellules endothéliales de capillaires et elle est détectée notamment dans les nouveaux capillaires qui envahissent le tissu de granulation au cours de la cicatrisation de blessures [26]. Un peptide cyclique qui bloque préférentiellement l'adhérence relayée par αvβ3 et un anticorps dirigé contre cette intégrine inhibent l'angiogenèse dans le modèle de la membrane chorioallantoïde du poulet et provoquent la régression rapide de tumeurs [27]. Ces antagonistes de αvβ3 provoquent l'apoptose des cellules endothéliales des vaisseaux en cours de développement, et non pas des vaisseaux établis.

Les intégrines sont aussi impliquées dans la localisation des activités protéolytiques qui dégradent la matrice extracellulaire sur le front d'invasion. Au cours de l'angiogenèse induite par le FGF-2 dans la membrane chorioallantoïde du poulet, l'intégrine αvβ3 et la métalloprotéinase MMP-2 (gélatinase A) sont détectées ensemble dans les nouveaux vaisseaux [28]. *In vitro*, la MMP-2 est capable d'interagir par l'intermédiaire de sa partie carboxy-terminale avec le récepteur αvβ3 exprimé à la surface de cellules de mélanome CS-1. Cette interaction n'inhibe pas l'activité catalytique de la MMP2, mais elle empêche l'adhérence des cellules sur la vitronectine. Une interaction entre l'intégrine β1 et le récepteur de l'uPA (activateur du plasminogène) a été mise en évidence dans les cellules embryonnaires de rein humain. Elle entraîne une perte de l'adhérence à la fibronectine relayée par cette intégrine et une stimulation de l'adhérence à la vitronectine relayée par le récepteur de l'uPA [29]. Cette interaction n'a pas été démontrée pour les cellules endothéliales, mais à la fois le récepteur de l'uPA et l'intégrine β1 sont présents au cours de l'angiogenèse.

Au cours de l'angiogenèse, les interactions des cellules endothéliales entre elles ou avec d'autres cellules sont remaniées. La VE-cadhérine participe à ce processus puisque les cellules souches embryonnaires (ES) déficientes en VE-cadhérine ne sont plus capables de se différencier vers la lignée endothéliale [30]. D'autres molécules d'adhérence présentes à la surface des cellules endothéliales activées au cours de l'angiogenèse permettent la fixation de monocytes qui produisent sur place des facteurs angiogéniques, ou de lymphocytes cytotoxiques [31].

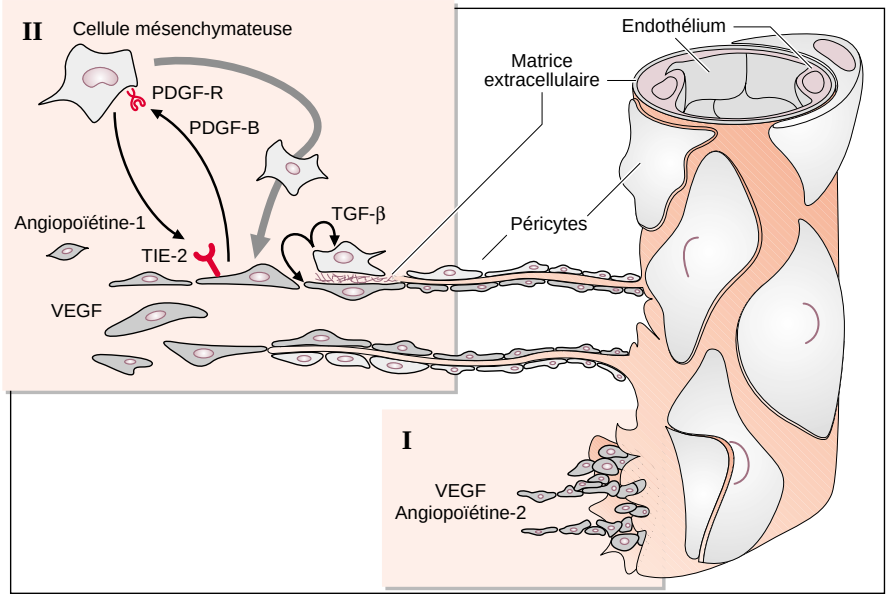

Figure 3. ***Un scénario pour la maturation des capillaires, élaboré à partir des résultats de recombinaison homologue et de l'étude de modèles* in vitro.** *(D'après [50].) (I). L'angiopoïétine-2 serait associée au bourgeonnement précoce de nouveaux vaisseaux en contribuant au relâchement des interactions entre cellules endothéliales, la matrice extracellulaire et les péricytes, ce qui rendrait les cellules endothéliales sensibles à l'action du VEGF. (II). L'angiopoïétine-1, comme le PDGF-B, participerait au recrutement des cellules mésenchymateuses voisines qui migrent vers le capillaire. TGF-β, activé lorsque cellules endothéliales et mésenchymateuses se contactent, induit la différenciation de ces dernières en péricytes, inhibe la prolifération vasculaire et stimule la production de matrice extracellulaire. L'angiopoïétine-1 stabilise ensuite des interactions entre les différents types cellulaires et la matrice extracellulaire.*

Les inhibiteurs naturels de l'angiogenèse

C'est dans les tissus non vascularisés qu'ont d'abord été recherchés des inhibiteurs de l'angiogenèse. Ainsi le produit d'un transcrit alternatif de *TIMP-1 (tissue inhibitor of metalloproteinases-1)* [32] a été purifié comme un inhibiteur dans des extraits de cartilage. Si la stimulation de l'angiogenèse au début de la progression tumorale est due à une diminution de la synthèse locale d'inhibiteurs, on peut aussi rechercher ces inhibiteurs dans le surnageant de cellules non transformées. C'est ainsi qu'a été identifiée l'activité du fragment de 140 kDa de la thrombospondine [33]. Un inhibiteur de l'angiogenèse sécrété après l'induction de l'expression de *P53* normale dans des cellules de glioblastome [34] est en cours de purification. Enfin, plus récemment, des nouveaux inhibiteurs de l'angiogenèse ont été identifiés dans des modèles murins de carcinogenèse caractérisés par l'existence de nombreuses micrométastases qui ne se développent pas en présence de la tumeur primitive. Ainsi, dans le sang des souris qui portent sous la peau des tumeurs dérivées de cellules de carcinome du poumon (3LL) a été purifiée l'angiostatine, un inhibiteur de l'angiogenèse qui bloque le développement des micrométastases dans le poumon *(m/s n° 2, vol. 11, p. 284)*. Un autre inhibiteur, l'endostatine a été purifié à partir du surnageant d'une lignée cellulaire (EOMA) dont l'injection provoque des hémangiomes et de nombreuses micrométastases [35].

On trouve dans la liste des inhibiteurs de l'angiogenèse des fragments protéolytiques de protéines qui parfois n'ont pas d'activité dans l'angiogenèse lorsqu'elles ne sont pas clivées. C'est le cas de l'angiostatine, fragment du plasminogène, de l'endostatine, fragment du collagène XVIII qui est principalement localisé à la périphérie des vaisseaux sanguins ou du fragment 16 kDa de la prolactine [36] dont on trouve des quantités importantes dans le plasma. La coupure protéolytique du *platelet factor 4* (PF-4) engendre un fragment qui inhibe beaucoup plus efficacement la prolifération des cellules endothéliales que PF-4 entier [37]. Ces résultats suggèrent que l'inhibition des activités protéolytiques qui induisent la maturation de ces facteurs risque de provoquer une augmentation de l'angiogenèse.

Les mécanismes d'action de ces inhibiteurs

Les cibles moléculaires de ces facteurs anti-angiogéniques sont encore mal connues. Le fragment 16 kDa de la prolactine inhibe la MAPK *(mitogen activated protein kinase)* activée par le VEGF et le FGF-2 [38], mais le récepteur de ce fragment n'a pas été identifié. Le fragment 140 kDa de la thrombospondine fixe le FGF-2 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire et c'est cette propriété qui a été invoquée pour expliquer sa capacité d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF-2 *in vitro*. *In vivo*, ce fragment exerce son activité anti-angiogénique par l'intermédiaire de l'un de ses récepteurs, la molécule CD36, comme le montrent des tests d'angiogenèse *in vivo* dans des souris *CD36*$^{-/-}$ (cité dans [39]) et des expériences *in vitro* avec des anticorps dirigés contre CD36 ou des protéines CD36 solubles [39]. L'angiostatine pourrait entrer en compétition avec le plasminogène pour la fixation à la vitronectine, et bloquer par cet intermédiaire l'angiogenèse relayée par l'intégrine $\alpha v\beta 3$. Récemment, deux groupes ont montré que la fumagilline ou son analogue, l'AGM 1470, se fixent de façon covalente sur la méthionine aminopeptidase et inhibent son activité [40]. L'activité de cette enzyme pourrait contrôler la stabilité des protéines du cycle cellulaire ou la localisation subcellulaire des protéines des voies de signalisation.

Il est vraisemblable que des inhibiteurs de l'angiogenèse participent au remodelage de l'arbre vasculaire au cours du développement normal. Cependant, l'inactivation des gènes codant pour le collagène XVIII et pour le plasminogène ne provoque pas de perturbation majeure dans le développement des vaisseaux sanguins, ce qui suggère que l'endostatine et l'angiostatine ne sont pas essentielles pour le contrôle de l'angiogenèse au cours du développement. Il est d'ailleurs possible que ces inhibiteurs ne soient pas capables d'affecter l'angiogenèse normale, puisque des souris soumises à un traitement par l'angiostatine ou l'endostatine pendant la moitié de leur vie normale ne présentent pas d'effets secondaires [41]. Les souris *thrombospondine*$^{-/-}$ se développent normalement ; cependant, la régression du réseau vasculaire au cours de l'involution de la glande mammaire après lactation est retardée (Luisa Iruela-Arispe, communication personnelle).

Le blocage de l'angiogenèse peut provoquer l'assoupissement des tumeurs

L'importance de l'angiogenèse pour le développement tumoral est suggérée par l'observation du comportement d'un fragment de tumeur implanté dans un site avasculaire comme la cornée. Quelques jours après l'implantation, des nouveaux capillaires se forment par bourgeonnement à partir des vaisseaux qui entourent la cornée ; le volume de la tumeur augmente de façon exponentielle à partir du moment où les artérioles et les veinules vont l'atteindre, se connecter entre elles par anastomose et véhiculer le sang [42].

Si la croissance, et aussi la dissémination, d'une tumeur dépendent de l'angiogenèse, il doit être possible de bloquer la progression tumorale en inhibant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [43]. Effectivement, des résultats remarquables ont été obtenus chez la souris en ciblant les facteurs angiogéniques, leurs récepteurs, la signalisation qui conduit à l'activation des cellules endothéliales, les molécules d'adhérence, les protéases dégradant la matrice extracellulaire, ou en utilisant des facteurs anti-angiogéniques *(figure 4)*.

Le plus souvent, les expériences publiées sont réalisées avec des cellules cancéreuses qui prolifèrent rapidement, et le traitement anti-angiogénique commence dès l'injection de ces cellules sous la peau de la souris. Cependant, la régression de tumeurs établies, dont le diamètre dépasse 1 cm, a été obtenue avec certains traitements, comme des immunotoxines ciblées contre les cellules endothéliales des vaisseaux irriguant ces tumeurs [44] ; cette régression est cependant suivie d'une nouvelle

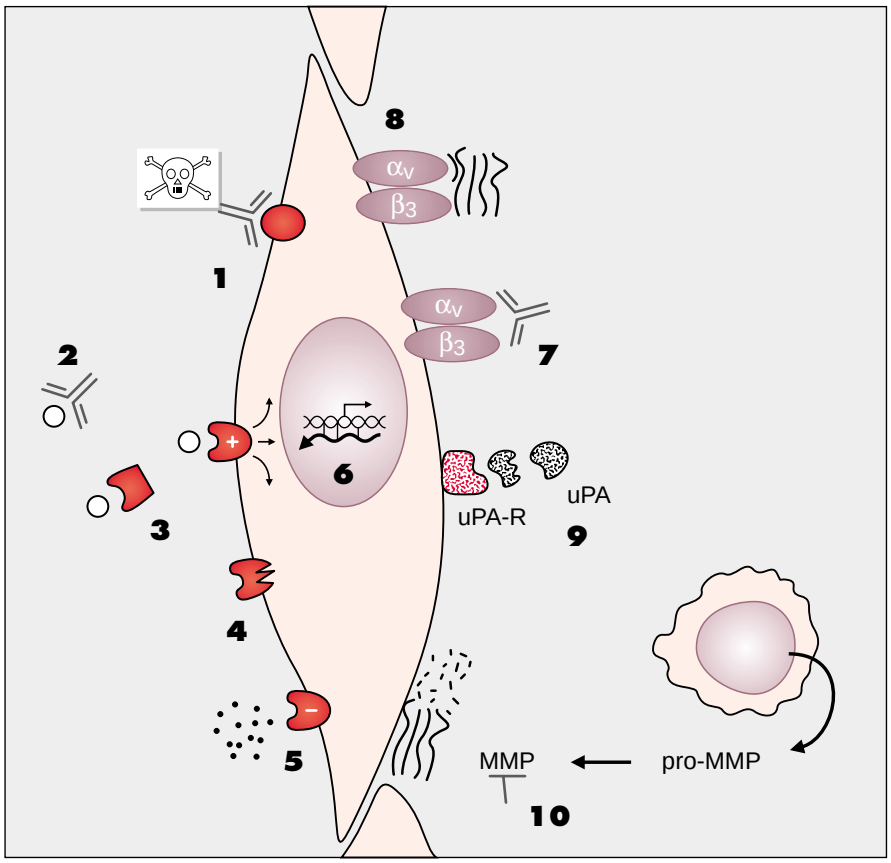

Figure 4. ***Chacune des étapes de l'activation des cellules endothéliales est susceptible d'offrir un créneau pour empêcher l'angiogenèse.*** *C'est ainsi qu'ont été utilisés: (1) des immunotoxines [44]; (2) des anticorps bloquant l'activité de facteurs angiogéniques comme le FGF2, le VEGF ou l'angiogénine [51]; (3) des formes solubles des récepteurs du VEGF [52]; (4) des mutants du VEGFR-2 qui s'associent à une sous-unité du VEGFR-2 normal et inhibent son activité [53]; (5) des inhibiteurs de l'angiogenèse comme l'angiostatine [46], l'interféron α et l'analogue de la fumagilline l'AGM 1470 [54]; (6) des oligonucléotides antisens; (7) des antagonistes des intégrines, comme des anticorps bloquant l'$\alpha_v\beta_3$, qui induisent l'apoptose des vaisseaux sanguins qui se développent [27]; (8) des peptides bloquant l'adhérence; (9) le domaine amino-terminal de l'uPA qui se comporte comme un antagoniste de son récepteur [54] ou (10) des inhibiteurs des protéases (MMP) comme le Marimastat.*

croissance 7 à 10 jours après le début du traitement. Lorsqu'une forme tronquée du facteur tissulaire (tTF) est dirigée vers l'endothélium tumoral, l'occlusion des vaisseaux provoque une régression complète de tumeurs établies chez 38 % des souris traitées [45]; pour 24 % des souris qui présentent une régression partielle, la croissance des tumeurs reprend à partir de leur périphérie *(figure 5)*. De la même façon, l'angiostatine [46] ou l'endostatine [35] provoquent, chez des souris immunodéficientes, un assoupissement de « tumeurs humaines » de 4 à 7 mm de diamètre, qui se réveillent quelques semaines après l'arrêt du traitement.

Comment éviter le réveil des tumeurs ?

Il serait donc indispensable d'envisager avec ces facteurs anti-angiogéniques des traitements à long terme, comme cela a été proposé pour bloquer le développement de métastases après résection de la tumeur primitive. On peut craindre alors qu'une injection systémique d'inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales ait des effets secondaires importants sur la cicatrisation des blessures, sur la capacité de l'endothélium artériel de se renouveler aux bifurcations de l'arbre vasculaire où le flux sanguin est turbulent, ou sur le cycle menstruel [47]. Cependant, comme il est vraisemblable que les mécanismes qui contrôlent l'angiogenèse normale et l'angiogenèse tumorale diffèrent, il est possible d'envisager des molécules qui bloquent spécifiquement le développement des vaisseaux sanguins dans les tumeurs.

Une façon d'éviter le réveil des tumeurs immédiatement après l'arrêt d'un traitement anti-angiogénique serait de lui associer un traitement dirigé vers les cellules cancéreuses elles-mêmes, une chimiothérapie ou une radiothérapie conventionnelles. Cette suggestion peut sembler paradoxale puisqu'une démarche thérapeutique ciblée sur l'endothélium empêche la délivrance des médicaments et l'oxygénation des cellules cancéreuses, et donc diminue l'efficacité de la chimiothérapie ou de la radiothérapie [48]. Cependant, une publication rapporte les effets synergiques obtenus chez la souris en ciblant simultanément l'angiogenèse et la prolifération des cellules cancéreuses par chimiothérapie [49]. Les cellules cancéreuses qui ont échappé à la nécrose après l'occlusion des vaisseaux par le facteur tissulaire se trouvent à la périphérie de la tumeur *(figure 5)*; elles sont donc accessibles aux médicaments anticancéreux.

Récemment, l'équipe de Judah Folkman (Boston, MA, USA) a montré que les cellules endothéliales ne développent pas de résistance à l'endostatine [41]. Si la tumeur se réveille après l'arrêt du traitement par l'endostatine, il est possible d'obtenir une nouvelle régression par un nouveau traitement. De plus, après plusieurs cycles de réveil et d'assoupissement, les tumeurs ne sont plus capables de se réveiller. Ce résultat encourageant a été obtenu avec différents types de cellules cancéreuses, cellules de mélanome B16, de fibrosarcome T421, ou de carcinome pulmonaire *(Lewis lung carcinoma)*. Cette expérience a été réalisée avec environ un gramme d'endostatine recombinante purifiée.

Une des questions majeures concerne le succès de stratégies similaires chez l'homme. Le passage de la souris à l'homme pose des problèmes

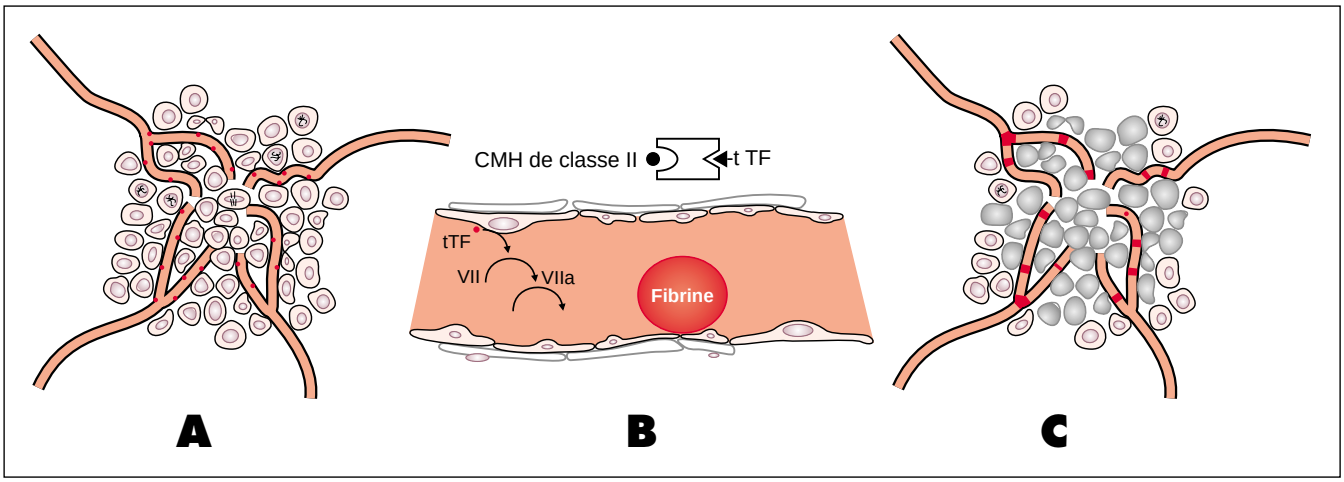

Figure 5. ***L'occlusion des vaisseaux par le facteur tissulaire provoque la régression de tumeurs établies. A.*** *Les cellules tumorales ont été transfectées pour produire de l'interféron γ qui induit dans les cellules endothéliales voisines l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II.* ***B.*** *La forme tronquée du facteur tissulaire (tTF) n'est pas capable de mettre en route la thrombose quand elle est en solution. Sa fixation à la surface de ces cellules endothéliales, grâce à un anticorps bispécifique, qui reconnaît à la fois un de ses épitopes non inhibiteurs et un des antigènes du CMH de classe II, déclenche la cascade de coagulation.* ***C.*** *Les cellules cancéreuses qui survivent à ce traitement sont situées à la périphérie des tumeurs.*

d'échelle (avant d'envisager le traitement de tumeurs humaines par l'endostatine, il faudrait produire ce facteur en grande quantité !), et de validité des modèles murins. Dans les tumeurs aggressives se développant en quelques semaines chez la souris, la structure des vaisseaux et leur réponse aux inhibiteurs n'est sans doute pas la même que dans des tumeurs présentes depuis plusieurs années chez l'homme. Il faudra aussi déterminer dans quelle mesure la physiologie des tumeurs qui ont été traitées avec succès chez la souris ressemble à la physiologie des tumeurs humaines qu'on cherchera à guérir. La microcirculation est très hétérogène à l'intérieur d'une tumeur et le flux sanguin peut varier de façon considérable dans des tumeurs humaines de même grade au même site [9]. Ces variations influencent la réponse des tumeurs aux traitements, qu'ils soient ciblés vers les cellules cancéreuses ou vers l'endothélium ■

Remerciements

Nous remercions Éric Maire pour son aide dans la réalisation des figures et Véronique Fafeur pour les nombreuses discussions et la lecture critique du manuscrit. Le travail dans le laboratoire est financé par le Cnrs, l'Institut Pasteur de Lille, la Ligue contre le Cancer, l'ARC, le GEFLUC et l'AICR. AP est boursier du CHRU de Lille.

RÉFÉRENCES

1. Pardanaud L, Yassine F, Dieterlen-Lièvre F. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 1989 ; 105 : 473-85.

2. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995 ; 11 : 73-91.

3. Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 1989 ; 140 : 1097-103.

4. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 ; 275 : 964-7.

5. Clark ER, Clark EL. Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living animal. *Am J Anat* 1938 ; 64 : 251-301.

6. Shi Y, O'Brien JE, Ala-Kokko L, Chung W, Mannion JD, Zalewski A. Origin of extracellular matrix synthesis during coronary repair. *Circulation* 1997 ; 95 : 997-1006.

7. Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 ; 231 : 586-90.

8. Meeson A, Palmer M, Calfon M, Lang R. A relationship between apoptosis and flow during programmed capillary regression is revealed by vital analysis. *Development* 1996 ; 122 : 3929-38.

9. Vaupel P, Schlenger K, Höckel M. Blood flow and tissue oxygenation of human tumors : an update. *Adv Exp Med Biol* 1992 ; 317 : 139-51.

10. Fan TPD, Brem S. *Angiosuppression in the search for new anticancer drugs.* In : Waring MJ, Ponder BAJ, eds. *Cancer biology and medicine.* Amsterdam : Kluwer Academic Publisher, 1992.

11. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 1997 ; 57 : 963-9.

12. Moghaddam A, Bicknell R. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in *Escherichia coli* and confirmation of its thymidine phosphorylase activity. *Biochemistry* 1992 ; 31 : 12141-6.

13. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, Akiyama S, Yamada Y. Angiogenic activity of enzymes. *Nature* 1994 ; 368 : 198.

14. Barleon B, Suzzani S, Zhou D, H.A. W, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated *via* the VEGF receptor flt-1. *Blood* 1996 ; 87 : 3336-43.

15. Senger DR. Molecular framework for angiogenesis. *Am J Pathol* 1996 ; 149 : 1-7.

16. Frelin C, Ladoux A, Bauters C. VEGF : médiateur de l'angiogenèse hypoxique. *Med Sci* 1997 ; 13 : 886-91.

17. Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er A, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has applications for retinopathy of prematurity. *Nat Med* 1995 ; 1 : 1024-8.

18. Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an antivascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 14765-70.

19. Dumont D, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo : a study of *flt-1, tek, tie* and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dynamics* 1995 ; 203 : 80-92.

RÉFÉRENCES

20. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, Gridley T, Wolburg H, Risau W, Qin Y. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature* 1995 ; 376 : 70-4.

21. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC, Yankopoulos GD. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor by secretion-trap expression cloning. *Cell* 1996 ; 87 : 1161-9.

22. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Requisite role of Angiopoietin-1, a ligand for the Tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 1996 ; 87 : 1171-80.

23. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 1997 ; 277 : 55-60.

24. Ingber DE, Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during Fibroblast Growth Factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: role of the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1989 ; 109 : 317-30.

25. Polverini PJ. Cellular adhesion molecules ; newly identified mediators of angiogenesis. *Am J Pathol* 1996 ; 148 : 1023-9.

26. Clark RA, Tonnesen MG, Gailit J, Cheresh DA. Transient functional expression of alphaVbeta 3 on vascular cells during wound repair. *Am J Pathol* 1996 ; 148 : 1407-21.

27. Brooks PC, Strömblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Anti-integrin αvβ3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995 ; 96 : 1815-22.

28. Brooks PC, Strömblad S, Sanders L, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresh DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin αvβ3. *Cell* 1996 ; 85 : 683-93.

29. Wei Y, Lukashev M, Simon DI, Bodary SC, Rosenberg S, Doyle MV, Chapman HA. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 1996 ; 273 : 1551-5.

30. Vittet D, Buchou T, Schweitzer A, Dejana E, Huber P. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 6273-8.

31. Melder RJ, Koenig GC, Witwer BP, Safabakhsh N, Munn LL, Jain RK. During angiogenesis, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor regulate natural killer cell adhesion to tumor endothelium. *Nat Med* 1996 ; 2 : 992-7.

32. Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage. *Science* 1990 ; 248 : 1408-10.

33. Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, LeBeau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6624-8.

34. Van Meir E, Polverini PJ, Chazin VR, Su Huang H, de Tribolet N, Cavenee WK. Release of an inhibitor of angiogenesis upon induction of wild type p53 expression in glioblastoma cells. *Nat Genet* 1994 ; 8 : 171-6.

35. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane W, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin : an endogenous inhibitor af angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997 ; 88 : 277-85.

36. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier DF, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 1993 ; 133 : 1292-9.

37. Gupta SK, Hassel T, Singh JP. A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 7799-803.

38. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 6374-8.

39. Dawson DW, Pearce FA, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the *in vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997 ; 138 : 707-17.

40. Sin N, Meng L, Wang MQW, Wen JJ, Bornmann WG, Crews CM. The anti-angiogenic agent fumagillin covalently binds and inhibits the methionine aminopeptidase, MetAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 6099-103.

41. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997 ; 390 : 404-7.

42. Muthukkaruppan V, Auerbach R. Angiogenesis in mouse cornea. *Science* 1979 ; 205 : 1416-8.

43. Gingras D, Béliveau R. L'angiogenèse tumorale : une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse. *Med Sci* 1997 ; 13 : 1428-35.

44. Burrows FJ, Thorpe PE. Eradication of large solid tumors in mice with an immunotoxin directed against tumor vasculature. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8996-9000.

45. Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington TS, Thorpe PE. Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 1997 ; 275 : 547-50.

46. O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C, Folkman J. Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat Med* 1996 ; 2 : 689-92.

47. Klauber N, Rohan RM, Flynn E, D'Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med* 1997 ; 3 : 443-6.

48. Jain RK. Delivery of molecular medicine to solid tumors. *Science* 1996 ; 271 : 1079-80.

49. Kakeji Y, Teicher BA. Preclinical studies of the combination of angiogenic inhibitors with cytotoxic agents. *Invest New Drugs* 1997 ; 15 : 39-48.

50. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997 ; 277 : 48-50.

51. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 6180-4.

52. Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LEH. Suppression of retinal neovascularization *in vivo* by inhibition of vascular endothelial growh factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995 ; 92 : 10457-61.

53. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk1 mutant. *Nature* 1994 ; 367 : 576-9.

54. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990 ; 348 : 555-7.

55. Min HY, Doyle LV, Vitt CR, Zandonella CL, Stratton-Thomas JR, Shuman MA, Rosenberg S. Urokinase receptor antagonists inhibit angiogenesis and primary tumor growth in syngeneic mice. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 2428-33.

Summary

Morphogenesis of the vascular tree

During morphogenesis of the vascular tree, the massive outgrowth of primitive capillaries is followed by the development and the maturation of some capillary branches whereas others regress. The direct observation and the manipulation of *in vivo* models, including a series of recent knock-out experiments, allow to delineate the mechanisms controlling this process, and to identify factors involved in the formation of a mature capillary, surrounded with a basal lamina and pericytes. Simultaneously new inhibitors have been purified from the study of tissues or micrometastases in which angiogenesis is blocked. Upon anti-angiogenic therapy tumors stop growing and can also shrink dramatically. They will eventually disappear following a conventional chemotherapeutic treatment or several cycles of anti-angiogenic treatment since endothelial cells do not develop drug resistance.