



HAL
open science

Rôle du facteur tissulaire dans les métastases hépatiques du cancer colo-rectal : vers une nouvelle cible thérapeutique ?

Philippe Zerbib

► To cite this version:

Philippe Zerbib. Rôle du facteur tissulaire dans les métastases hépatiques du cancer colo-rectal : vers une nouvelle cible thérapeutique ?. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2008. Français. NNT: . tel-00316075

HAL Id: tel-00316075

<https://theses.hal.science/tel-00316075>

Submitted on 2 Sep 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LILLE II

N°

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Présentée et soutenue publiquement par

Philippe ZERBIB

Le 30 juin 2008

**Rôle du facteur tissulaire dans les métastases hépatiques du
cancer colorectal : vers une nouvelle cible thérapeutique?**

Directeur de thèse : Madame le Professeur Brigitte Jude

Rapporteurs : Monsieur le Professeur Olivier Glehen
Monsieur le Professeur Philippe Nguyen
Examineurs : Monsieur le Professeur Jean-Pierre Chambon
Monsieur le Professeur François-René Pruvot

Aux membres du jury

A Madame le Professeur Brigitte JUDE

J'ai beaucoup appris à vos côtés, en découvrant un monde qui n'était pas le mien. Soyez assurée de ma volonté à poursuivre notre collaboration et de ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur Jean Pierre CHAMBON

Vous m'avez appris ce que je sais en chirurgie. Que la sobriété de ces mots ne masque pas l'essentiel qu'ils recouvrent. Soyez assuré de mon profond respect et de ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur François René PRUVOT

Vos conseils bienveillants et votre enseignement ont toujours été des guides importants. Soyez assuré de mon dévouement et de ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur Olivier GLEHEN

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur et de juger cette thèse. Votre disponibilité et vos conseils cliniques avisés m'ont été d'une grande aide. Soyez assuré de ma profonde gratitude et de ma plus grande estime.

A Monsieur le Professeur Philippe N'GUYEN

Vous me faites l'honneur d'être rapporteur et de juger cette thèse en tant que spécialiste du facteur tissulaire. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de ma grande estime.

Ces travaux ont été réalisés dans l'équipe d'accueil EA-2693 du Professeur Brigitte JUDE, Faculté de médecine, Université de Lille II et le laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille. Le FFR-VIIa nous a été gracieusement fourni par les laboratoires NovoNordisk, Danemark.

Je tiens également à remercier pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et leur gentillesse Delphine Corseaux, Alexandre Ung, Alexandre Grimonprez ainsi que l'ensemble du personnel des laboratoires d'hématologie et d'anatomo-pathologie.

Sommaire

	N° de page
<u>SOMMAIRE</u>	4
<u>ABREVIATIONS</u>	8
<u>RESUME</u>	12
<u>INTRODUCTION</u>	14
<u>DONNEES DE LA LITTERATURE</u>	17
I. Généralités	18
I. 1. Epidémiologie	
I. 2. Anatomopathologie et anomalies génétiques	
I. 3. Histoire naturelle, classification des cancers colorectaux, bases thérapeutiques	
II. Principes actuels du traitement chirurgical	25
II. 1. Les règles carcinologiques de colectomie	
II. 2. Traitement chirurgical des métastases hépatiques	
II. 3. Embolisation pré-opératoire	
II. 4. Méthodes de destruction locale des métastases hépatiques	
II. 5. Facteurs pronostiques des métastases hépatiques	
III. Apport de la chimiothérapie	30
III. 1. Définition des chimiothérapies adjuvantes, néoadjuvantes et palliatives	
III. 2. Chimiothérapies adjuvantes actuelles	
III. 3. Chimiothérapies néoadjuvantes	
III. 4. Chimiothérapies palliatives	
IV. Physiopathologie du processus tumoral	33
IV. 1. Structure histologique et génèse du stroma tumoral	
IV. 2. Parallèle : cicatrisation – développement du stroma tumoral	
IV. 3. Angiogénèse tumorale	
<i>IV. 3. 1. Les canaux « Vasculogenic mimicry » ou pseudo-vaisseaux tumoraux</i>	
<i>IV. 3. 2. Les vaisseaux lymphatiques</i>	

IV. 3. 3. Les vaisseaux sanguins

IV. 4. Physiopathologie de la dissémination métastatique

V. L'angiogénèse comme cible thérapeutique dans le cancer colorectal 47

V. 1. Classification et mécanisme d'action des médicaments antiangiogéniques

V. 2. Les effets indésirables des médicaments antiangiogéniques

V. 2. 1. L'hypertension artérielle

V. 2. 2. La protéinurie

V. 2. 3. Retard de cicatrisation cutanée

V. 2. 4. Perforations digestives

V. 2. 5. Hémorragies et Thromboses

V. 2. 6. Leucoencéphalopathie réversible postérieure

V. 2. 7. Insuffisance cardiaque

V. 2. 8. Insuffisance endocrine

VI. Vers de nouvelles cibles thérapeutiques :

Hémostase et facteur tissulaire

55

VI. 1. Le facteur tissulaire

VI. 1. 1. Structure du facteur tissulaire

VI. 1. 2. Rôle du facteur tissulaire dans la coagulation

VI. 1. 3. Expression tissulaire et cellulaire du facteur tissulaire

VI. 1. 4. Facteur tissulaire plasmatique

VI. 1. 5. Régulation de l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa par les inhibiteurs physiologiques

VI. 1. 6. Rôle du facteur tissulaire dans l'embryogénèse, la migration cellulaire et l'angiogénèse

VI. 1. 6. 1. Rôle du facteur tissulaire dans l'embryogénèse

VI. 1. 6. 2. Rôle du facteur tissulaire dans l'angiogénèse

VI. 1. 6. 3. Effet antiapoptotique de la liaison FT-FVIIa

VII. Rôle du facteur tissulaire dans la croissance tumorale, l'angiogénèse tumorale et le potentiel métastatique 69

VII. 1. Tumeurs et cellules tumorales exprimant le facteur tissulaire

VII. 2. Facteur tissulaire et cancer colorectal

VII. 3. Modifications génétiques tumorales et facteur tissulaire	
VIII. Possibilités de modulation pharmacologique du facteur tissulaire	72
VIII. 1. Modulation de l'expression	
VIII. 2. Inhibition directe de l'activité du facteur tissulaire	
<u>TRAVAUX PERSONNELS</u>	76
1. Les modèles de métastases hépatiques	
2. Résumé des travaux	
3. Discussion	
<u>CONCLUSION</u>	110
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	112

Abréviations

AA	Acide Aminé
ACE	Antigène Carcino-Embryonnaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ad-pRSV-TK	Construction adénovirale comprenant le gène TK placé sous le contrôle d'un promoteur fort RSV (Rous Sarcoma Virus)
AP-1	Activation Protein 1
APC	Adenomatous polyposis coli
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASIS	Active Site-Inactivated factor Seven
AT	Antithrombine
BER	Système de réparation par excision de bases
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CAM	Cell Adhesion Molecules
CCR	Cancer colorectal
CIMP	CpG Island Methylator Phenotype
CML	Cellule Musculaire Lisse
Cox2	Cyclo-oxygénase 2
CRP	C Reactive Protein
CTNA	Chimiothérapie Néoadjuvante
DCC	Deleted in colorectal cancer
EGF, EGFR	Epidermal Growth Factor, Récepteur de l'EGF
Egr	early growth response gene 1
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EPPO	Embolisation portale pré-opératoire
FVII, FVIIa	Facteur VII, Facteur VII activé
FIX, FIXa	Facteur IX, Facteur IX activé
FX, FXa	Facteur X, Facteur X activé
FXI	Facteur XI
FXII	Facteur XII
FXIIIa	Facteur XIII activé
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FT	Facteur tissulaire
FU	Fluoro Uracile

GAG	Glycosaminoglycane
GCV	Ganciclovir
HIF	Hypoxia Inductible Factor
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A
HNPCC	Hereditary non polyposis colorectal cancer
IL	Interleukine
INF	Interféron
IV	Intra veineuse
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
KHPM	Kininogène de Haut Poids Moléculaire
LAM3	Leucémie Aigüe Myéloblastique type 3
LDL	Light Density Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharide
LRE	Lipopolysaccharide Responsive Element
LV	Leucovorine
MAP	Polypose associée à MYH
MAP kinase	Mitogen Activated Protein kinase
MH	Métastase hépatique
MHz	Méga Hertz
Min	Minute
MMP	Métalloprotease
MMR	MisMatch Repair
MSPI	Matrix-associated Serine Protease Inhibitor
MUTYH, ou MYH	Mut Y Homologue
NF-κB	Nuclear Factor κB
NO	Monoxyde d'azote
NK	Natural Killer
PAF	Polypose adénomateuse familiale
PAR	Protease Activated Receptor
pb	paire de bases
PC	Protéine C
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PK	Prékalllicrine

PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PP5	Placental Protein 5
PS	Protéine S
PSGL-1	P Selectin Glycoprotein Ligand - 1
RF	Radiofréquence
RT-PCR	Reverse transcriptase – Polymerase chain reaction
SRR	Serum Responsive Region
SVF	Serum de veau foetal
TFPI, TFPIr	Tissue Factor Pathway Inhibitor, Tissue Factor Pathway Inhibitor recombinant
TGF	Tumor growth factor
TIMP	Tumor Inhibitor Metallo Proteases
TK	Thymidine Kinase de l'herpès virus simplex de type 1
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNM	Tumor-Node-Metastasis
t-PA	Tissue Plasminogen Activator
TP53	Gène de la protéine p53
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Light Density Lipoprotein

Résumé

Le cancer colo-rectal (CCR) est, avec 36500 nouveaux cas par an, au premier rang des cancers en France. Le traitement est avant tout chirurgical et son pronostic reste sombre avec 40 % de survie à 5 ans tous stades confondus. L'apparition de métastases hépatiques (MH) constitue un facteur pronostique essentiel et représente la première cause de mortalité chez ces patients.

Le facteur tissulaire (FT), récepteur cellulaire du facteur VII (FVII) de la coagulation possède un rôle majeur dans l'angiogénèse et le potentiel invasif des CCR. Le FT participe à l'angiogénèse par l'intermédiaire de sa voie protéolytique (thrombine) ou directement par le complexe FT-FVIIa. Il est exprimé par les cellules tumorales coliques et sa corrélation avec la croissance tumorale colique est démontrée.

Nous avons analysé l'effet de l'inhibition de la voie du FT par un inhibiteur compétitif du facteur VIIa (FFR-VIIa) dans un modèle expérimental syngénique de MH induites chez le rat BDIX. Nous avons pu montrer que cette inhibition s'opposait au développement de MH lorsque le FFR-VIIa était injecté très précocement dans le processus métastatique, au stade micrométastatique. A l'inverse, lorsque le FFR-VIIa était injecté plus tardivement, au stade de macrométastases hépatiques, nous n'avons pas observé d'effet anti-tumoral. Le FFR-VIIa a également été sans effet anti-tumoral dans un modèle de tumeurs sous cutanées.

En conclusion, l'effet anti-tumoral du FFR-VIIa dans notre modèle pourrait être dû à une absence d'adhésion des cellules tumorales dans le foie. Nos résultats suggèrent que l'activité protéolytique du complexe FT-FVIIa est une cible thérapeutique dans le cancer du colon, mais soulève de nombreuses questions quant aux mécanismes et aux conditions d'efficacité des traitements ciblant ce complexe. D'autres mécanismes tels qu'une induction de l'apoptose dans les cellules tumorales devront être explorés. Enfin, une étude clinique visant à corréler le taux de FT circulant au stade TNM du CCR est en cours.

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est le cancer le plus fréquent en France et, malgré le traitement chirurgical de la tumeur primitive, il est encore grevé d'une lourde mortalité, du fait de l'évolution métastatique, essentiellement hépatique. En effet, si la tumeur primitive colorectale est entièrement résécable dans plus de 90 pour cent des cas, au stade de métastases hépatiques, seule une faible proportion de patient pourra être opérée de façon curative. Le devenir spontané des patients porteurs de métastases hépatiques non résécables est de 1 à 2 % de survie à 5 ans. Ainsi, l'amélioration du pronostic viendra bien entendu d'une amélioration du contrôle de la tumeur primitive, mais surtout des métastases hépatiques qui représentent encore aujourd'hui la première cause de mortalité des patients atteints d'un CCR.

La prise en charge clinique du CCR doit aujourd'hui être multidisciplinaire, incluant les chirurgiens, les oncologues, les gastro-entérologues, les radiologues. Les résultats obtenus par les laboratoires de recherche ouvrent la porte à de nouvelles données, et à de nouveaux concepts, dans les domaines de la cancérogénèse, de l'angiogénèse, des anomalies génétiques. Les nouvelles thérapeutiques comme l'immunothérapie, les anticorps monoclonaux, la thérapie génique et les nouvelles molécules de chimiothérapie sont autant de voies de recherche prometteuses. En particulier, les stratégies anti-angiogéniques constituent une arme anti-tumorale supplémentaire dans le CCR. Il est admis qu'une tumeur nécessite pour se développer la sécrétion par les cellules cancéreuses de médiateurs solubles qui activent la formation de nouveaux vaisseaux. L'idée selon laquelle s'opposer à la vascularisation d'une tumeur pourrait constituer une nouvelle stratégie anticancéreuse a émergé dans les années 70 avec le concept d'angiogénèse tumorale formulé par Judah Folkman [1]. La découverte en 1989 du facteur angiogénique de l'endothélium vasculaire VEGF et d'autres nouvelles protéases a permis d'imaginer des perspectives thérapeutiques nouvelles.

Notre travail s'est quant à lui intéressé aux liens entre hémostasie et cancer, et en particulier au facteur tissulaire (FT) comme cible thérapeutique dans le CCR. Le lien entre hémostasie et cancer a été pressenti de longue date, depuis la première description de l'association entre phlébites et cancer par Armand Trousseau en 1865 [2]. Le FT est le récepteur du facteur VII (FVII) de la coagulation, et est l'initiateur physiologique de la cascade de la coagulation. De nombreuses publications ont souligné son rôle majeur dans le potentiel invasif de nombreux cancers, et en particulier des CCR. Les mécanismes en jeu sont complexes, associant vraisemblablement activation de la coagulation et génération de fibrine, mais aussi l'activation de voies de signalisation intracellulaires, et activation de l'angiogénèse tumorale. Nous avons émis l'hypothèse que le FT pourrait être une cible thérapeutique, et exploré cette hypothèse dans plusieurs modèles de CCR chez le rat.

Dans une première partie de ce travail, nous apporterons les données de la littérature qui nous ont permis de forger cette hypothèse, et dans la seconde, nous rapporterons les principaux résultats obtenus, que nous discuterons ensuite.

Données de la littérature

I. Généralités sur le cancer colorectal

I. 1. Epidémiologie

Le cancer colorectal (CCR) est un problème de santé publique. Il se situe au 4^{ème} rang des cancers dans le monde avec environ 875000 nouveaux cas par an. Il représente la deuxième cause de mortalité par cancer en Europe de l'Ouest et aux Etats-Unis. Sa répartition est inégale, et on considère que les pays industrialisés (Amérique du Nord, Europe et Australie) rassemblent 63 % de l'ensemble des cas avec un gradient d'incidence croissant du Sud vers le Nord. La France compte parmi les pays européens ayant la plus forte incidence (33500 nouveaux cas par an et près de 15 % de l'ensemble des cancers) et le CCR est le cancer le plus fréquent en France. On distingue :

- les CCR situés sur le colon proximal où le sex-ratio (H/F) est de 1, dont l'incidence augmente,
 - ceux du colon distal dont le sex-ratio est de 1,5 dont l'incidence est stable
 - et enfin les cancers de l'ampoule rectale avec un sex-ratio de 2 et dont l'incidence diminue.
- Malgré cette incidence globale croissante, le nombre de décès par CCR est resté stable ces 20 dernières années. Le pronostic s'est donc amélioré, même si le taux de survie à 5 ans reste médiocre, estimé à 41 % par les registres français [3].

On estime classiquement qu'un sujet sur 20 développera au cours de son existence un CCR. Près de 80 % des CCR sont sporadiques (Figure 1), l'incidence maximale se situant entre 65 et 70 ans.

Vingt pour cent sont des formes familiales. Parmi elles, des formes rares (2 à 6 % de l'ensemble des CCR) et très bien définies, sont la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le cancer colorectal héréditaire sans polypose (syndrome HNPCC pour «Hereditary non polyposis colorectal cancer»). L'âge moyen d'apparition est alors plus précoce, de l'ordre de 44 ans. A côté de ces formes familiales précoces bien définies, on reconnaît maintenant que 10 à 35 % des CCR surviennent dans un contexte de prédisposition familiale. En effet, les apparentés de patients porteurs de CCR « sporadiques » ont un risque plus élevé que la population générale par la transmission de « gènes dominants de susceptibilité non caractérisés » [4, 5]. Le risque relatif pour les enfants de sujets porteurs de CCR est de 2 à 3 fois supérieur pour les adénomes coliques et les CCR. Ce risque étant par ailleurs encore plus important chez les enfants de patients jeunes et lorsque au moins 2 membres de la famille sont porteurs de CCR. Une étude chez les jumeaux a montré que 35 % des CCR étaient dû à une transmission génétique [6].

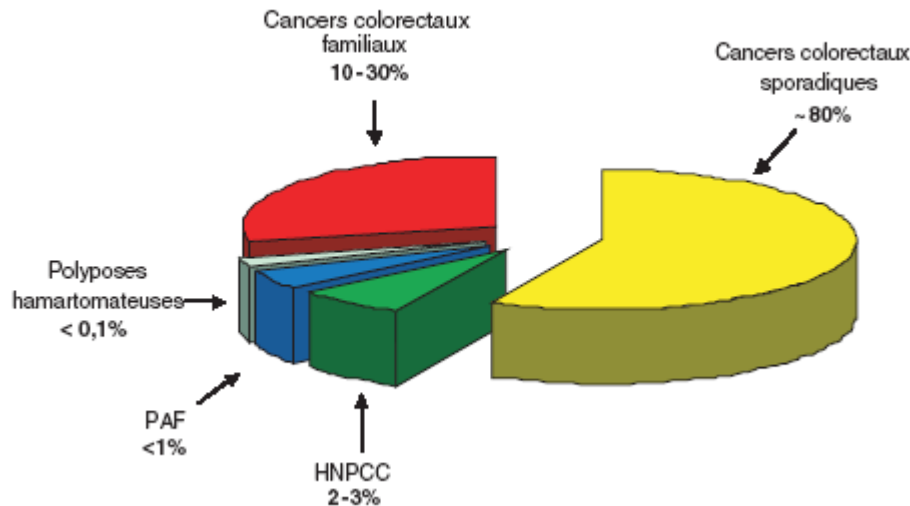


Figure 1 : Répartition épidémiologique des cancers colorectaux. D'après Kemp [7].

I. 2. Anatomopathologie et anomalies génétiques

Le développement de la tumeur, à travers les différentes couches de la paroi du colon, est déterminant pour décider la meilleure stratégie thérapeutique à mettre en oeuvre. Les différentes couches de la paroi, de l'intérieur vers l'extérieur, sont :

- La muqueuse qui comporte un épithélium de revêtement à majorité de cellules caliciformes qui rentre dans la muqueuse en « cryptes de Lieberkühn ». Le chorion est riche en tissu lymphoïde (lymphocytes diffus et follicules lymphoïdes débordant vers la musculaire muqueuse). Ce tissu est riche en vaisseaux sanguins qui permettent la récupération des nutriments liés à la fonction d'absorption.
- La musculaire-muqueuse est une mince couche de tissu musculaire lisse.
- La sous-muqueuse est constituée de tissu conjonctif et contient le plexus nerveux de Meissner ainsi que des vaisseaux sanguins et lymphatiques pour la muqueuse.
- La musculaire a une disposition générale en 2 couches de tissu musculaire lisse (circulaire interne et longitudinale externe). Entre ces deux couches se situe le plexus nerveux d'Auerbach.
- La tunique externe, est une séreuse infiltrée de tissu adipeux.

Plus de 90% des CCR sont des adénocarcinomes c'est à dire développés aux dépens de l'épithélium de la muqueuse colorectale. Cet épithélium s'invagine pour former les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn. Presque toutes ces tumeurs trouveraient leur origine dans un adénome bénin ou un polype. C'est la classique séquence adénome-carcinome. La première étape du développement du CCR est l'apparition d'une hyperprolifération de l'épithélium colique. Au plan morphologique, la première anomalie décelable est le foyer de

cryptes aberrantes. Il s'agit de cryptes au calibre élargi entourées d'un épithélium épaissi avec une mucosécrétion diminuée. Il en existe 2 formes, hyperplasiques et dysplasiques. Les formes hyperplasiques sont caractérisées par une stratification des noyaux, une présence de mitoses dans les deux tiers superficiels des cryptes et une raréfaction des cellules caliciformes. Elles représentent environ 5 % des foyers de cryptes aberrantes et sont l'équivalent de micro-adénomes. Ces foyers de cryptes aberrantes ne sont pas visibles en coloscopie standard et leur détection nécessite l'utilisation de vidéo-endoscopes à optique grossissante et de colorants (chromoendoscopie au bleu de méthylène).

La prolifération anormale de cellules immatures incapables d'envahir le chorion tend à s'accumuler dans et au dessus de la muqueuse, et aboutit à la formation de polype adénomateux. Il s'agit d'une véritable lésion pré-cancéreuse qui correspond déjà à l'expansion clonale de cellules mutées. Certains polypes adénomateux vont augmenter de taille et être le siège de modifications morphologiques progressivement croissantes appelées dysplasie. La dysplasie comprend des anomalies cellulaires (nucléaires et cytoplasmiques) et architecturales. Les anomalies sont d'intensité variable, classées en dysplasie de bas et haut grade.

Les connaissances dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire des CCR ont considérablement évolué au cours de la dernière décennie. L'émergence d'un clone cellulaire qui prolifère, envahit et métastase malgré les différents niveaux de contrôle de l'organisme, n'est possible que par l'accumulation de nombreuses anomalies génétiques. Le CCR est un des meilleurs exemples du processus multiétape de cancérogenèse. La description des anomalies génétiques dans les CCR en rapport avec l'expression des facteurs angiogéniques et en particulier du FT sera abordée plus loin (Chapitre VII).

Les gènes touchés par ces anomalies (gènes cibles) sont potentiellement tous les gènes qui contrôlent le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire et tous les phénomènes de la cancérogenèse. On distingue les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur.

Les proto-oncogènes ont une action positive sur la prolifération cellulaire. Leurs versions mutées (oncogènes) sont actives de façon excessive ou inappropriée. Il suffit de la modification d'une seule copie du gène pour activer un oncogène. Le plus impliqué dans le CCR est KRAS2 (K-ras).

Les gènes suppresseurs de tumeur au contraire ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Les deux copies du gène doivent être modifiées pour qu'il perde sa fonction inhibitrice. Les gènes suppresseurs de tumeur les plus impliqués dans le CCR sont APC (Adenomatous Polyposis Coli), TP53 (gène de la protéine p53) et DCC (Deleted in Colorectal Cancer) [8]. L'activation de K-Ras et l'inactivation de la protéine p53 ont en plus de leurs rôles dans la cancérogenèse colique, une probable action proangiogénique par

laquelle le système vasculaire de l'hôte participe à la croissance tumorale et à la diffusion métastatique [9].

Les anomalies génétiques touchant les gènes cibles sont au nombre de 3 :

- anomalies chromosomiques : les segments les plus fréquemment perdus dans le CCR sont le bras long du chromosome 5 (5q, contenant APC), le bras court du 17 (17p, contenant p53), le bras long du 18 (18q, contenant DCC).

- anomalies nucléotidiques : elles peuvent entraîner un gain de fonction (pour les oncogènes) ou une perte de fonction (pour les gènes suppresseurs de tumeur).

- anomalies épigénétiques : en particulier méthylation du promoteur d'un gène bloquant sa transcription.

A côté de ces anomalies génétiques, ont été identifiées des **instabilités** génétiques :

- chromosomique, la plus fréquente dans le CCR (80 % des tumeurs sporadiques).

Elle entraîne des anomalies de nombre des chromosomes et des pertes alléliques fréquentes. De plus, les pertes alléliques sont fréquemment associées à des mutations de TP53 ou d'APC conduisant à une inactivation des deux copies de ces gènes suppresseurs. Le ou les gènes responsables de cette instabilité chromosomique ne sont pas encore connus, mais il pourrait s'agir entre autres du gène APC, dont la protéine joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose [10].

- nucléotidique, due à l'inactivation d'un système de réparation de l'ADN. Deux systèmes de réparation différents ont été impliqués dans la cancérogenèse colique : le système de réparation des mésappariements de bases (gènes MMR pour MisMatch Repair) (MLH1 et MSH2, mais aussi hMSH6, PMS2 et MLH3), et le système de réparation par excision de bases (BER). La déficience du système MMR est responsable de mutations fréquentes dans des séquences répétées de nucléotides de l'ADN, appelées microsatellites. Les mutations touchent des gènes cibles contenant des microsatellites : le gène du récepteur de type II du TGF β , le gène suppresseur de tumeur BAX, dans certains cancers familiaux mais aussi dans 15 % des tumeurs sporadiques. Le gène dont les mutations sont retrouvées dans le CCR est MUTYH (pour Mut Y Homologue ou MYH). Elle n'est pour le moment, retrouvée que dans un type de cancer héréditaire (MAP, polypose associée à MYH), mais la découverte de son implication dans les CCR est récente [11, 12]. La déficience du BER est responsable d'une sensibilité accrue aux lésions oxydatives, avec des mutations spécifiques.

- épigénétique, qui concerne 20 à 30 % des tumeurs sporadiques. Cette voie de cancérogenèse intéresse les tumeurs de phénotype CIMP (pour CpG Island Methylator Phenotype). Celui-ci entraîne l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de leurs promoteurs.

De nombreuses mutations ont, d'autres parts, été décrites dans certaines formes de cancer familial. Elles ne seront pas détaillées ici.

I. 3. Histoire naturelle, classification des CCR, bases thérapeutiques

Le risque d'évoluer vers un cancer est d'autant plus important que la dysplasie est sévère, de haut grade. Lorsque les anomalies cellulaires et architecturales sont majeures mais que la membrane basale n'est pas franchie par les cellules tumorales on utilise le terme de cancer *in situ* ou cancer intra-épithélial. L'effraction de la membrane basale périglandulaire avec invasion du chorion muqueux définit l'étape de transformation adénocarcinomeuse. Il est habituellement admis de réserver le terme d'adénocarcinome invasif aux lésions qui dépassent la musculaire muqueuse. Il n'y a pas de capillaire lymphatique dans le chorion superficiel de la muqueuse colorectale, et le risque de métastase est faible pour les tumeurs qui n'ont pas dépassé la musculaire muqueuse. Après franchissement de la musculaire muqueuse, le foyer d'adénocarcinome s'étend progressivement en profondeur dans la paroi colorectale, d'abord dans la sous-muqueuse, puis dans la musculature, puis dans la sous-séreuse et le cas échéant dans la séreuse. L'extension en profondeur de l'adénocarcinome est un facteur pronostique important et doit être évaluée, conformément aux recommandations de la conférence de consensus de janvier 1998 sur le cancer du colon, selon la classification TNM (Tumor – Node – Metastasis) (Figure 2).

A un stade tardif de l'évolution du CCR, les cellules malignes génétiquement instables accumulent les mutations et certains clones acquièrent la capacité de métastaser. La localisation principale des métastases à distance est hépatique par voie hématogène, *via* la circulation porte.

T (tumeur)

Tis : développement intra-épithélial ou chorion

T1 : extension sous-muqueuse

T2 : extension musculéuse

T3 : extension à travers la muscularis propria dans la sous-séreuse ou dans les tissus péricoliques non péritonealisés.

T4 : extension à l'organe ou structure de voisinage et/ou perforation du péritoine viscérale

N (ganglion)

N0 : pas de métastase ganglionnaire

Nx : ganglions non évalués ou moins de 8 ganglions examinés

N1 : 1 à 3 ganglions métastatiques régionaux

M (métastase) ou N2 (4 ganglions métastatiques régionaux ou plus)

M0 : pas de métastase

M1 : métastases à distance (dont ganglions sus-claviculaires)

Figure 2 : Classification TNM (6e version de 2002).

A partir des données de la classification TNM, les cancers du côlon sont classés en 4 stades par l'UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*) (Figure 3). Les chances de guérison varient considérablement du stade I au stade IV. Pour chacun des stades est noté entre parenthèses le taux de survie à 5 ans [13]. La stratégie thérapeutique est également adaptée à chacun de ces stades.

<p>Stade I (93,2%): T1-T2 N0 M0</p> <p>Stade II : T3-T4 N0 M0</p> <p>Stade IIA (84,7%) : pT3 N0 M0</p> <p>Stade IIB (72,2%) : pT4 N0 M0</p> <p>Stade III : tous T N1-N2 M0</p> <p>Stade IIIA (83,4%) : pT1-T2N1M0</p> <p>Stade IIIB (64,1%) : pT3-T4N1M0</p> <p>Stade IIIC (44,3%) : tous T N2M0</p> <p>Stade IV (8,1%) : métastases à distance</p>

Figure 3 : Stadification de l'UICC. La lettre « p » signifie que la stadification a été réalisé sur la pièce opératoire. En fonction du contexte dans lequel la classification est réalisée (urgence, pièce opératoire, écho-endoscopie pré-opératoire) le stade TNM est précédé des lettres *u*, *p* ou *us*.

L'extension lymphatique revêt avec l'extension veineuse et nerveuse une importance pronostique considérable. L'envahissement ganglionnaire concerne environ 1/3 des cancers coliques et varie selon l'extension en profondeur de la tumeur (0 % pour les tumeurs in situ, 3 à 10 % pour les tumeurs atteignant la sous-muqueuse et 60 % au delà). L'extension ganglionnaire se fait de proche en proche et l'extension discontinue est l'exception. Les métastases ganglionnaires à distance sont pratiquement toujours précédées par des métastases paratumorales.

L'envahissement des veines situées au contact de la tumeur réalise de véritables thromboses dont le caractère pronostique péjoratif est comparable à celui de l'envahissement lymphatique. Il en est de même de l'envahissement nerveux des différents plexus de la paroi colique.

L'apparition de métastases hépatiques (MH) au cours de l'évolution d'un CCR constitue un véritable « évènement pronostique » et représente la première cause de mortalité. On considère en effet que le pronostic de ce cancer est lié au développement et à la progression de la maladie métastatique hépatique plus qu'à celui de la tumeur colorectale primitive, qui est le plus souvent résécable [14]. Les métastases pulmonaires, cérébrales, osseuses, sont beaucoup plus rares. Lors du diagnostic initial de CCR, environ 25% des patients présentent des MH [15, 16] et plus de 50 % des patients développeront des MH au cours de l'évolution de leur maladie. Une récente étude écossaise sur 3200 patients opérés de CCR entre 1991 et 1994 a montré qu'1 patient sur 5 présentait une tumeur localement avancée ou une maladie métastatique lors du diagnostic initial [17].

Avec l'aide des moyens d'imagerie actuels, la proportion de MH synchrones (diagnostic simultané à celui de la tumeur colorectale ou dans les 3 mois) a augmenté.

Une étude récente a montré que parmi 13000 patients porteurs d'un CCR, la proportion de MH synchrones est passée de 12,9 à 17% entre 1976 et 2000 alors que la proportion de MH métachrones (délai de découverte des métastases supérieur à 3 mois avec la tumeur primitive) est descendue de 19,8 à 12,2% [18]. Les patients sont donc mieux classés au départ en stades TNM, ce qui contribue à l'amélioration de la survie lorsque la chirurgie est curative [19].

II. Principes actuels du traitement chirurgical

II. 1. Les règles carcinologiques de colectomie

La chirurgie demeure le traitement essentiel du CCR.

Les principes carcinologiques concernant l'extension de l'exérèse digestive en fonction du siège de la tumeur et l'étendue du curage ganglionnaire ont été établis depuis longtemps et ne font plus l'objet de controverse [20]. Les principes de l'exérèse à visée curative d'un cancer colique quel qu'en soit le siège comportent deux règles fondamentales :

- Elle est toujours associée à un curage ganglionnaire emportant le territoire de drainage lymphatique correspondant ; L'examen d'au moins 8 ganglions dans le produit du curage est nécessaire à l'évaluation correcte du statut ganglionnaire pour la conférence de consensus française [3] et d'au moins 12 pour l'UICC [21].
- La section du tube digestif doit emporter au moins 5 cm de côlon macroscopiquement sain de part et d'autre de la tumeur.

En revanche, l'intérêt d'associer à cette exérèse un curage ganglionnaire extensif (iliaque primitif et latéro-aortique) n'est pas démontré. La ligature première des vaisseaux avant toute dissection limite en théorie l'essaimage des cellules cancéreuses par voie portale, mais son intérêt n'est pas démontré. Cette notion remonte à des travaux anciens dans les années soixante [22] mais n'a jamais été confirmée. De la même façon, l'exclusion de la tumeur primitive par ligature colique de part et d'autre de la tumeur qui limiterait la dissémination des cellules cancéreuses par voie intra-luminale colique, n'a pas démontré son efficacité.

Cependant, la manipulation tumorale pendant la dissection chirurgicale a été rendue responsable d'une dissémination de cellules tumorales accrue à partir de la tumeur primitive [23]. L'incidence des MH après exérèse de la tumeur primitive peut être expliquée par la croissance de micro-MH initialement méconnues ou le développement de cellules tumorales disséminées lors de la chirurgie de la tumeur colique. La mise en place de stent colique a également été rendue responsable d'une augmentation des cellules tumorales circulantes [24]. Ces micro-MH sont difficiles à détecter. Les techniques de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) ont montré une grande sensibilité dans la détection

des cellules tumorales disséminées d'origine colorectale [25-28]. Une étude récente a même montré l'intérêt pronostique de la présence de telles cellules tumorales circulantes dans le sang veineux périphérique détectées en RT-PCR dans les 24 premières heures suivant la résection chirurgicale, sur l'incidence des récurrences [29]. Il a été montré qu'il existait des cellules tumorales circulantes chez 80 % des patients qui bénéficiaient de l'exérèse à visée curative de MH. Trente sept % des patients avaient également des cellules tumorales libres intra-hépatiques [30]. Les cellules tumorales intra-hépatiques peuvent provenir d'une migration par voie hématogène mais également de communications vasculaires intra-hépatiques entre l'artère hépatique et la veine porte au niveau du sinusoiide hépatique [31]. La recherche per-opératoire et l'étude du ganglion sentinelle proposée initialement dans les cancers de la verge, les mélanomes cutanés et les cancers du sein, pourrait permettre un « ultrastaging » de 12 à 15 % des tumeurs initialement classées pN0. Cependant, la valeur pronostique de ces micro-métastases ganglionnaires reste très débattue et l'intérêt d'une chimiothérapie adjuvante dans ce sous-groupe de tumeurs n'est actuellement pas démontré [32, 33].

Au moins 7 études prospectives randomisées ont montré la faisabilité et le bénéfice de la laparoscopie dans la colectomie pour cancer colique [34-40]. La laparoscopie a fourni les mêmes résultats que ceux de la chirurgie ouverte en terme de morbidité, de mortalité et de qualité de vie, avec toutefois un meilleur "confort" post-opératoire immédiat et une morbidité pariétale probablement moindre. La reprise du transit et la durée d'hospitalisation ont été plus courtes dans le groupe de patients opérés par laparoscopie.

La laparoscopie a permis de reproduire une colectomie carcinologique analogue à celle faite en chirurgie ouverte, sans majorer le risque opératoire, ni le taux de récurrences dès lors que le chirurgien a fait l'objet d'une formation adéquate. Enfin la chirurgie laparoscopique ne doit s'adresser qu'aux tumeurs de petite taille et à celles ne franchissant pas la paroi de l'intestin, les contre-indications étant les tumeurs T4 envahissant les structures anatomiques de voisinage pour lesquelles la recommandation est l'exérèse " mono-bloc " en laparotomie. Lorsqu'il existe des MH synchrones, c'est-à-dire découvertes en même temps que la tumeur primitive, non résécables et sans espoir de résécabilité ultérieure et en l'absence de complication locale (occlusion, perforation, hémorragie...), la résection initiale de la tumeur primitive colique n'est pas recommandée.

II. 2. Traitement chirurgical des métastases hépatiques

Actuellement, le seul traitement curatif des MH est représenté par l'exérèse chirurgicale par métastasectomie ou hépatectomie avec un taux de mortalité dans les centres experts inférieur à 3 %. Il n'y a pas de réel consensus quant à la résection hépatique synchrone ou

en 2 temps de la tumeur primitive colique. La tendance actuelle est de proposer chaque fois que l'expérience du chirurgien le permet, la résection hépatique dans le même temps que l'exérèse colique [41-43].

Le taux de survie est alors de 26 à 51 % à 5 ans [15, 44]. Cependant, seul 10 à 20 % de l'ensemble des patients porteurs de MH pourront être opérés [45-47]. Le taux de survie à 5 ans pour les patients porteurs de MH non opérés, traités par chimiothérapie seule, est inférieur à 3 % [15]. Le pronostic est directement lié à la diffusion des MH au sein du parenchyme hépatique. Ainsi, la médiane de survie est de 21, 15 et 12 mois pour respectivement une MH unique, des MH unilobaires (localisées à un seul lobe hépatique) et des MH bilobaires (réparties dans les 2 lobes hépatiques) inopérables [48]. Les nouvelles chimiothérapies comme l'oxaliplatine et l'irinotecan ont amélioré le pronostic mais la médiane de survie reste d'environ 16 mois [49].

Les principales contre-indications à la résection sont :

- Le mauvais état général des patients et les comorbidités associées rendant l'intervention chirurgicale déraisonnable
- La quantité insuffisante de parenchyme hépatique restant si la résection est décidée
- La diffusion extra-hépatique de la maladie.

II. 3. Embolisation portale pré-opératoire (EPPO)

Une des principales limitations à la résection est l'insuffisance de parenchyme hépatique fonctionnel après chirurgie. On considère qu'en deçà de 30 % de l'ensemble du volume du foie, le risque d'insuffisance hépatique post-opératoire est majeur. L'EPPO permet une atrophie du lobe hépatique homolatéral et une hypertrophie compensatrice du lobe controlatéral. Cette EPPO a permis dans une série à 63 % de patients jugés initialement non résécables d'être finalement opéré. Le taux de survie à 5 ans était comparable à celui des patients ayant bénéficié d'une résection d'emblée [50]. L'EPPO a réduit le nombre de récidives intra-hépatiques après résection [51].

II. 4. Méthodes de destruction locale des MH

Lorsque la chirurgie d'exérèse est contre-indiquée, ces méthodes de destruction locale (employées seules ou associées à la chirurgie) constituent une alternative à la chimiothérapie palliative. Cela dit, la frontière entre ces différentes méthodes a tendance à disparaître et actuellement une chimiothérapie dite palliative peut conduire vers la résection d'une métastase jugée initialement non résécable. Parmi ces méthodes de destruction locale

on note la radiofréquence [52, 53], la cryothérapie [54, 55], les ultrasons de haute intensité [56, 57], le laser [58] et les micro-ondes (2450 MHz) [59].

Le principe de la cryothérapie est de provoquer une destruction tissulaire par l'utilisation de très basses températures. Les résultats entre résection hépatique seule et résection hépatique associée à une cryothérapie, ont été similaires en terme de médiane de survie [60].

La radiofréquence (RF) est la méthode la plus répandue. Une échographie per-opératoire guide l'aiguille de RF au sein de la MH. Cette aiguille génère une hyperthermie locale entre 70 et 100°C, aboutissant à la destruction des cellules tumorales par dénaturation protéique et lésions microvasculaires. La destruction complète de la MH est confirmée en tomographie par une plage d'hypodensité stable dans le temps.

La médiane de survie dans une analyse rétrospective a été de 37 mois dans le groupe RF (*versus* 41 mois dans le groupe chirurgie) [61].

Une comparaison rétrospective entre RF et ré-hépatectomie pour récurrence de MH a montré des résultats similaires entre les deux techniques [62]. Le taux de survie à 4 ans pour des MH non résécables traitées par RF ou chimiothérapie seule a montré un bénéfice en faveur de la RF (22 % *versus* moins de 15 %, $p < 0,005$) [63]. Adam a montré chez des patients porteurs de MH non résécables, après chimiothérapie néoadjuvante par 5FU, Leucovorine et Oxaliplatine ou Irinotecan, qu'une attitude agressive pouvait donner des résultats satisfaisants. En effet, chez les patients répondeurs à la chimiothérapie, une hépatectomie majeure était réalisée emportant le lobe hépatique le plus atteint par les MH. Les MH controlatérales étaient traitées par RF. Ainsi, 12,5 % des patients devenaient opérables avec un taux de survie à 5 ans de 33 % [64].

Après destruction locale de MH, la chimiothérapie n'a pas fait la preuve de son efficacité.

II. 5. Facteurs pronostiques des MH

Même en cas de résection complète des métastases (R0), 75 % des patients présenteront une récurrence des MH. Différents scores ont été proposés avec comme double but, la sélection des meilleurs candidats à la chirurgie et le pronostic de cette chirurgie. Fong a sélectionné 5 critères préopératoires à partir de 1001 patients opérés à visée curative : un taux d'ACE supérieur à 200 ng / ml, un nombre de métastases supérieur à 1, une taille de la plus grande métastase supérieure à 5 cm, un envahissement ganglionnaire de la tumeur initiale et un intervalle libre de moins de 12 mois. Chaque paramètre compte pour 1 point. Le taux de survie à 5 ans a varié de 60% (score 0) à 14% (score 5), en passant par 40% (score 1-2) et 20% (score 3-4). Les auteurs ont conclu à l'efficacité de la chirurgie seule pour les scores

inférieurs à 2, l'importance d'un traitement adjuvant à la chirurgie pour les scores 3-4, et la nécessité d'essai thérapeutique pour les scores 5 [65].

La progression tumorale des MH sous chimiothérapie a été montrée comme un facteur pronostique particulièrement défavorable même en cas de chirurgie hépatique apparemment curative [66].

Une étude récente a cependant nuancé l'importance de certains facteurs pronostiques. Par exemple, le nombre de MH a peu influencé le taux de survie à 5 ans, et l'espérance de vie après résection chirurgicale chez les patients porteurs de 4 MH ou plus a été équivalente à celle des patients porteurs d'une MH solitaire [44].

La dissémination extra-hépatique des lésions coliques secondaires représente une classique contre-indication à la résection chirurgicale. Cependant, Elias a récemment montré que lorsque ces localisations extra-hépatiques (métastases pulmonaires, ovariennes, ganglionnaires hépatiques) pouvaient être réséquées dans le même temps que les MH, le taux de survie à 5 ans était équivalent entre les groupes avec et sans localisations extra-hépatiques. Plus que la localisation, c'était le nombre total de métastases qui influait sur le pronostic [67].

Dans une étude prospective récente rapportée par Jaeck, l'impact pronostique de l'envahissement ganglionnaire du pédicule hépatique a également été discuté. Lorsque l'envahissement ganglionnaire était limité au ligament hépato-duodéal et à la portion rétro-pancréatique, le taux de survie après résection était significativement meilleur qu'en cas d'envahissement ganglionnaire autour de l'artère hépatique commune et du tronc coeliaque (38 % vs 0 %, $p < 0,001$) [68, 69].

Plus que la notion de marge minimum de 1cm, la validation histologique de marge saine paraît primordiale pour le contrôle local. Elias a montré qu'en cas de marge inférieure à 10mm, il n'existait pas de différence pronostique entre une marge comprise entre 0-4mm et 5-9mm [70]. Ces résultats ont été plus récemment confirmés par Pawlik [71]. Même lorsqu'il existait un envahissement microscopique des marges (R1) le taux de survie à 5 ans a été de 17 %.

Le foie est le site de récurrence le plus fréquent et reste un site unique de récurrence dans environ 30 % des cas [72, 73]. Il a été montré que les re-hépatectomies pour récurrence avaient le même taux de morbi-mortalité et le même pronostic que la première résection hépatique [74, 75].

L'invasion et la diffusion métastatique ne sont pas seulement le fait de caractéristiques propres à la tumeur mais dépendent également de l'environnement péri-tumoral. Ainsi, la réponse inflammatoire de l'hôte est un élément de plus en plus déterminant dans la progression tumorale [76, 77]. Un taux plasmatique de C Reactive Protein (CRP) au-delà de 10 mg/l a été corrélé à un taux de mortalité supérieure et un taux de récurrence plus important,

indépendamment du stade de Duke, chez des patients opérés à visée curative [78-80]. De plus, l'élévation plasmatique de la CRP, en association avec le stade TNM, était corrélé à la survie [81, 82]. Chez des patients opérés de MH de CCR, un taux plasmatique élevé de CRP préopératoire a été associé avec un taux de survie inférieur. La survie moyenne a été de 19 et 43 mois lorsque respectivement la CRP préopératoire était élevée ou normale [83].

III. Apport de la chimiothérapie

III. 1. Définition des chimiothérapies adjuvantes, néoadjuvantes et palliatives

La chimiothérapie adjuvante se définit comme une chimiothérapie « préventive » des métastases, en l'absence de métastase identifiée au moment de la chirurgie de la tumeur primitive. En situation adjuvante, le traitement est utilisé après la chirurgie, dans le but d'éradiquer les cellules cancéreuses restantes et d'augmenter le taux de guérison.

Le traitement adjuvant offre, non seulement l'espoir d'augmenter la durée de vie des patients, mais également d'obtenir une guérison complète sans rechute de la maladie. Ainsi, la chimiothérapie adjuvante s'oppose à la chimiothérapie palliative (réalisée lorsque les lésions tumorales (coliques ou hépatiques) ne sont pas résécables), qui n'a, quant à elle, l'ambition que de prolonger la survie.

La chimiothérapie néoadjuvante (CTNA) est réalisée avant la chirurgie dans le but de contrôler la diffusion métastatique en période pré-opératoire. Une CTNA doit donc être considérée comme un « pré-traitement » avant une chirurgie dont l'intention reste curative.

III. 2. Chimiothérapies adjuvantes actuelles

Il est clairement établi que les CCR de stade III de l'UICC (N+) doivent faire l'objet d'un traitement adjuvant à base de 5 fluoro-uracile (FU) - acide folinique [84]. Le 5 FU est un anticancéreux de la classe des antimétabolites. Il freine la mitose cellulaire, prend la place de l'uracile dans les désoxyribonucléotides. Le désoxyribonucléotide du 5-FU inhibe la thymidilate synthétase empêchant la méthylation de l'acide désoxyridylique en acide thymidylique et interfère donc dans la biosynthèse de l'ADN.

Une telle chimiothérapie adjuvante diminue l'incidence des récives et prolonge la survie [85, 86]. Il a également été constaté qu'il existait un bénéfice de survie pour les stades II (N0) mais avec un effet moindre que pour le groupe précédent. Les progrès d'aujourd'hui sont en rapport avec l'utilisation de nouvelles molécules : Irinotecan, Oxaliplatine et les fluoropyrimides orales.

L'irinotécan (Campto[®]), dérivé semi-synthétique de la camptothécine, est un cytostatique inhibiteur spécifique de l'ADN topoisomérase I. Cette inhibition entraîne des lésions de l'ADN, qui bloquent la fourche de réplication et sont responsables de l'activité cytotoxique. Celle-ci est fonction du temps de contact avec les cellules, et spécifique de la phase S. Dans la plupart des tissus, l'irinotécan est métabolisé par les carboxylestérases en un métabolite actif, le SN-38. Celui-ci est plus actif que l'irinotécan sur la topoisomérase I purifiée et plus cytotoxique sur diverses lignées de cellules tumorales murines ou humaines.

L'oxaliplatine (Eloxatine[®]), est un antinéoplasique de type alkylant. Il inhibe la synthèse et la réplication de l'ADN par formation de ponts intrabins entre 2 guanines adjacentes.

La capecitabine (Xeloda[®]) est une pro-drogue qui appartient à la famille des fluoropyrimidines. Après administration par voie orale elle est métabolisée dans l'organisme en 5-FU, le produit actif qui lui-même est métabolisé en plusieurs métabolites actifs ou inactifs.

La comparaison entre le traitement standard LV5FU2 (5 Fluoro-Uracile et acide folinique selon le schéma de deGramont [87]) seul ou associé à l'oxaliplatine (protocole Folfox4) a montré une réduction des rechutes à 3 ans et à 4 ans respectivement de 23 % et de 24 % dans le groupe Folfox4 confirmant la supériorité du protocole Folfox4 sur le traitement standard. Ces résultats ont permis d'obtenir en 2004 une autorisation de mise sur le marché pour l'oxaliplatine dans l'indication de traitement adjuvant du cancer colique au stade III. L'indication d'une chimiothérapie adjuvante pour les stades II du cancer colique doit se discuter au cas par cas [88].

L'adjonction d'Irinotecan en situation adjuvante n'a pas montré sa supériorité par rapport au traitement standard par LV5FU2.

Les fluoropyrimidines orales (Capecitabine, Xeloda[®]) ont montré une efficacité au moins équivalente à celle du traitement standard par LV5FU2 en situation adjuvante pour les cancers coliques de stades III. L'incidence des récurrences et la survie ont en effet été meilleures sans toutefois atteindre le seuil statistique de significativité. La forme orale a d'autre part été mieux acceptée par les patients que la voie intraveineuse [89, 90]. Ces résultats ont validé l'indication en mars 2005 du Xeloda[®] dans le traitement adjuvant des cancers coliques de stade III [91]. Cependant, plus que la voie d'administration orale ou IV, ce sont les effets indésirables qui ont influencé le plus la préférence des patients [92].

III. 3. Chimiothérapie néoadjuvante (CTNA)

L'avenir proche sera probablement de rendre opérables des malades ayant des lésions initialement non résecables. C'est le but de la CTNA, en cours d'évaluation. Même chez les patients ayant d'emblée des lésions résecables, la CTNA semble augmenter le taux de

résection R0 (résections complètes) et facilite les hépatectomies limitées. Cette CTNA pourrait également sélectionner les bons candidats à la chirurgie en excluant les patients avec une maladie métastatique très évolutive. Enfin, elle pourrait être utilisée comme un test de chimio-sensibilité pour adapter une chimiothérapie post-opératoire [64]. Les nouvelles associations combinant 5FU, Leucovorine (folinate de calcium, le sel calcique de l'acide folinique), Oxaliplatine et Irinotecan qui ont montré leur supériorité sur les associations classiques LV5FU2 en situation adjuvante, semblent être également les plus efficaces en situation néo-adjuvante [93-96].

A côté de la voie systémique, la CTNA par voie intra-artérielle (cathéter introduit dans l'artère gastro-duodénale) a montré un taux de réponse important lorsqu'elle était utilisée en première ou deuxième ligne [97, 98]. Les termes de « première ou deuxième ligne de chimiothérapie » définissent les protocoles de chimiothérapie utilisés en première ou deuxième intention, étant entendu qu'une deuxième ligne de chimiothérapie vient remplacer une première ligne inefficace ou mal supportée.

Les bons candidats à une CTNA intra-artérielle sont les patients avec des MH isolées, en bon état général, sans ascite ni hyperbilirubinémie [98-100].

Plus récemment ont été développées des molécules à visée antiangiogénique. Deux nouvelles molécules, l'Avastin[®] (Bevacizumab) et l'Erbitux[®] (Cetuximab), des anticorps monoclonaux dirigés respectivement contre le VEGF (*Vascular Endothelium Groth Factor*) et l'EGFR (*Endothelial Groth Factor Receptor*), ont obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 2004 et 2005 dans les CCR métastatiques en association avec une chimiothérapie classique [101-104]. L'Avastin[®] est un anticorps monoclonal de type IgG1 qui se lie au VEGF et inhibe de ce fait la liaison du VEGF à ses récepteurs, Flt-1 (VEGFR-1) et KDR (VEGFR-2), situés à la surface des cellules endothéliales, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Il est constitué d'une partie constante d'origine humaine et d'une partie variable d'origine murine.

L'Erbitux[®] est un anticorps monoclonal chimérique homme-souris qui se lie spécifiquement au domaine extra-cellulaire du récepteur du facteur de croissance épidermique humaine (EGFR). Il est composé de la région Fv d'un anticorps murin anti-EGFR et des régions constantes IgG1 humaines (chaines lourdes et kappa). Il est produit par culture cellulaire d'un myélome murin. Le Cetuximab se lie spécifiquement avec le récepteur de l'EGF (HER1 ou c-ErbB-1) qui est présent à la fois sur les cellules normales et tumorales et inhibe la liaison du facteur de croissance EGF et du TGF- α . Le blocage du récepteur entraîne la non-activation des kinases associées au récepteur, une inhibition de la croissance cellulaire, une induction de l'apoptose, une diminution des métallo-protéinases de la matrice extra-cellulaire et une diminution de la vascularisation.

Les principes sous-jacents à cette utilisation seront développés plus loin (Chapitre VI), ainsi que leurs limites.

III. 4. Chimiothérapie palliative

Lorsque la ou les MH sont jugées non résecables, une chimiothérapie palliative constitue alors le seul recours possible. Cependant, la notion de chimiothérapie palliative a tendance à se transformer ces dernières années et on considère actuellement que des patients dont les MH sont jugés initialement non résecables doivent être réévalués pour détecter ceux qui deviennent secondairement opérables. Une récente étude prospective, randomisée, a montré avec l'association de nouvelles molécules (oxaliplatine et irinotecan, protocole FOLFOXIRI), un taux de réponse globale de 60 %, une survie médiane de 22,6 mois et une possibilité de résection secondaire complète des MH dans 36 % des cas [105]. Ceci au prix d'une toxicité importante essentiellement neurologique et hématologique.

Lorsque les possibilités de résection chirurgicale des MH sont dépassées, on perçoit donc toutes les insuffisances des traitements chimiothérapeutiques qui, même s'ils constituent une solution encourageante, restent d'efficacité médiocre et non sans toxicité. Tout doit donc être fait en amont du processus métastatique pour tenter de s'opposer à l'apparition des MH. Ceci passera par l'amélioration des traitements dits adjuvants ou néo-adjuvants, mais également par une meilleure compréhension de la physiopathologie même du processus tumoral et métastatique.

IV. Physiopathologie du processus tumoral

Une tumeur est un ensemble disparate mais coordonné, constitué d'une population cellulaire hétérogène dont une partie seulement est cancéreuse. Le tissu d'accompagnement est modifié si on le compare à celui du tissu sain. Il existe donc un processus adaptatif qui a permis de définir le « stroma des cancers » comme l'ensemble des structures mésenchymateuses modifiées qui soutient les cellules cancéreuses [106].

Dans la majorité des cas, la tumeur est constituée d'un épithélium « malade » et d'un tissu de soutien « influencé » qui en font une structure complexe. À côté des cellules carcinomateuses organisées selon des architectures plus ou moins caractéristiques, se trouve le stroma des cancers, avec ses fibroblastes, une vascularisation sanguine et lymphatique, et des infiltrats de types cellulaires multiples du système immunitaire (macrophages, mastocytes, lymphocytes). Une matrice extracellulaire soutient ces cellules dans toutes les formes de cancer invasif.

IV. 1. Structure histologique et genèse du stroma tumoral

Le stroma tumoral est composé de divers éléments que l'on peut regrouper en 3 catégories : les vaisseaux, les cellules inflammatoires (lymphocytes, macrophages, mastocytes) et le tissu conjonctif. Ce dernier inclut la matrice extracellulaire composée de fibres (collagène et élastine), de glycoprotéines (fibronectine), de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes. Bien que ces mêmes éléments composent tous les stromas accompagnant les cellules cancéreuses, leur quantité varie d'une tumeur à l'autre. D'un extrême à l'autre on peut citer des tumeurs desmoplasiques du sein, de l'estomac ou du pancréas dont plus de 90% de la masse est constituée de stroma, ou bien des tumeurs comme les mélanomes malins qui possèdent très peu de stroma. Concernant les adénocarcinomes coliques, la quantité de stroma est proportionnelle au degré de différenciation (bien équilibrée avec la prolifération épithéliale dans les formes bien différenciées et abondant dans les formes peu différenciées). La marge de la tumeur qui représente le front d'invasion est le lieu où la formation du « stroma des cancers » peut le mieux être étudiée, puisqu'elle suit de près, accompagne ou même précède les cellules cancéreuses. La construction passe par 3 phases :

- Réaction inflammatoire par envahissement du tissu conjonctif différencié par des macrophages, des polynucléaires et des lymphocytes.
- Mise en place d'une membrane basale entre le mésenchyme (tissu conjonctif) et l'épithélium (cellules cancéreuses) par l'action commune des cellules cancéreuses et des cellules du stroma.
- Activation des cellules sanguines qui migrent dans le tissu conjonctif avoisinant les cellules cancéreuses, pour contribuer à l'édification de la tumeur [106]. Ce mécanisme n'est pas sans rappeler le phénomène physiologique de cicatrisation [107].

IV. 2. Parallèle : cicatrisation - développement du stroma tumoral

La cicatrisation d'une blessure et le développement du stroma d'une tumeur d'origine épithéliale sont des processus dynamiques et progressifs, qui impliquent l'interaction de nombreuses cellules. La comparaison de ces deux phénomènes révèle des mécanismes similaires (Figure 4).

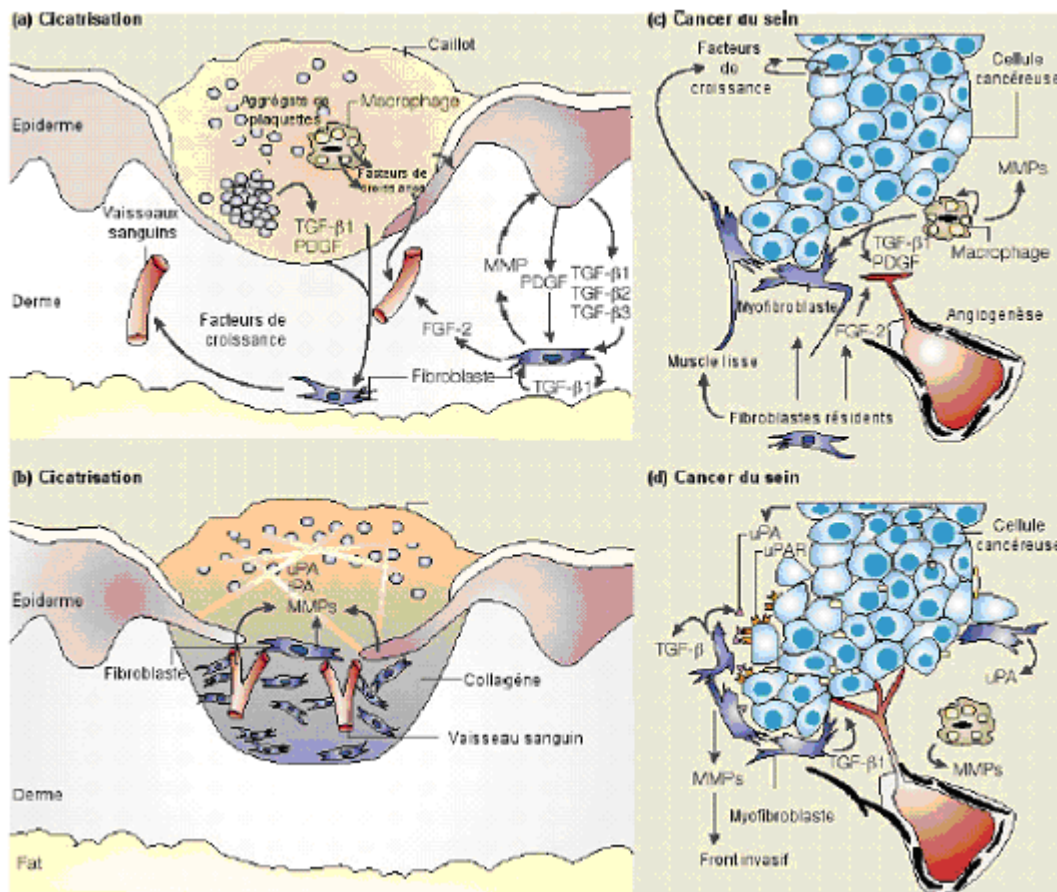


Figure 4 : Parallèle entre la cicatrisation d'une blessure cutanée et la mise en place d'un stroma tumoral dans le cancer du sein. D'après Bissell [107]. (a) Après une blessure, on observe la formation d'un caillot et un recrutement de plaquettes qui ont pour effet d'activer les cellules inflammatoires et les fibroblastes. (b) Après l'activation de ces cellules et la formation de néovaisseaux, la migration des cellules épithéliales à partir des marges de la blessure va se dérouler, avant un retour à un état stable par la formation d'une matrice mature (peu cellulaire et constituée de collagène). (c) Les cellules cancéreuses vont agir sur le stroma environnant et recruter des fibroblastes et des cellules inflammatoires. (d) Une fois le recrutement réalisé, on assiste à un remodelage (dégradation et synthèse de composés) de la matrice avoisinante qui favorise à la fois la migration des cellules cancéreuses dans de nouveaux territoires et la formation de nouveaux vaisseaux. A la différence de la cicatrisation, la cascade de ces événements est permanente.

La cicatrisation et la génération du stroma tumoral d'un carcinome débutent par une exsudation de protéines plasmatiques incluant le fibrinogène, la fibronectine et le plasminogène. L'activation du processus de coagulation, aboutissant à la formation de fibrine forme en association avec la fibronectine, une matrice provisoire. Simultanément, une importante libération des cytokines par les cellules épithéliales favorise la migration et la stimulation des macrophages, des fibroblastes et la formation de nouveaux vaisseaux. On assiste ensuite à une modification du phénotype des cellules épithéliales. Après avoir perdu leur pouvoir d'adhésion, elles acquièrent une plus grande mobilité sur la matrice

provisoire. Ce mouvement cellulaire permet de reformer un épithélium intact dans le cadre de la cicatrisation ou favorise une invasion du tissu sain pour la tumeur.

Dans les deux cas, la matrice provisoire est ensuite dégradée par des protéases, telles que les métalloprotéases, pour former un stroma mature constitué de fibres de collagène. La formation de ce stroma est liée à l'afflux de fibroblastes, et aussi de macrophages et à la formation de vaisseaux [108]. Les macrophages sont une source de facteurs de croissance, les fibroblastes une source de synthèse du collagène qui vont stabiliser les cellules épithéliales ; les vaisseaux quant à eux permettent l'apport de nutriments et d'oxygène, nécessaires aux remaniements tissulaires. Pour une formation de nouveaux vaisseaux, il est indispensable, en plus des facteurs angiogéniques, d'avoir une matrice extracellulaire et les récepteurs endothéliaux adéquats. La fibronectine est un de ces éléments importants. Le dépôt de ce composé permet la migration des cellules endothéliales [109].

Les différences entre la cicatrisation et la génération de stroma tumoral portent sur l'initiation du phénomène, sur la nature des cellules activatrices et sur la durée de chaque étape. Lors du phénomène physiologique de cicatrisation, ce sont les plaquettes qui sont les éléments initiateurs de la sécrétion des médiateurs vaso-actifs et des chémoattractants pour les cellules inflammatoires et les fibroblastes. Dans le cas du développement tumoral, ce sont principalement les cellules cancéreuses qui vont jouer ce rôle. Une des différences importantes porte sur le fait que les cellules épithéliales, dans la cicatrisation, vont redevenir quiescentes une fois stabilisées sur la matrice définitive, alors que les cellules cancéreuses vont continuer à jouer un rôle très actif sur le stroma environnant. De plus, la formation de la matrice provisoire est un processus de courte durée dans la cicatrisation, alors que dans le cas d'une tumeur, les facteurs inducteurs étant toujours actifs, cette structure reste perpétuellement présente sur le front d'invasion de la tumeur.

Cette formation du stroma tumoral sur le modèle de la cicatrisation montre que les cellules cancéreuses ont mis à profit un système déjà existant chez l'hôte, pour pouvoir évoluer et survivre. Pour l'hôte, la tumeur peut alors se comparer à une blessure qui ne guérit pas [110].

IV. 3. Angiogénèse tumorale

Une tumeur maligne présente une vascularisation au même titre qu'un organe. Celle-ci se développe lorsque la tumeur atteint une taille critique de 0,2 à 2 mm de diamètre (10^5 à 10^6 cellules), en raison de la présence de territoires en manque de nutriments et d'oxygène, c'est-à-dire en hypoxie. Par contre, contrairement à un organe normal, cette vascularisation est très anarchique et elle n'est pas toujours fonctionnelle. On peut observer 3 familles de vaisseaux : les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et une troisième famille

obtenue par un phénomène connu sous le terme anglais de « vasculogenic mimicry » ou pseudo-vaisseaux tumoraux, dont la nature est encore très controversée (Figure 5).

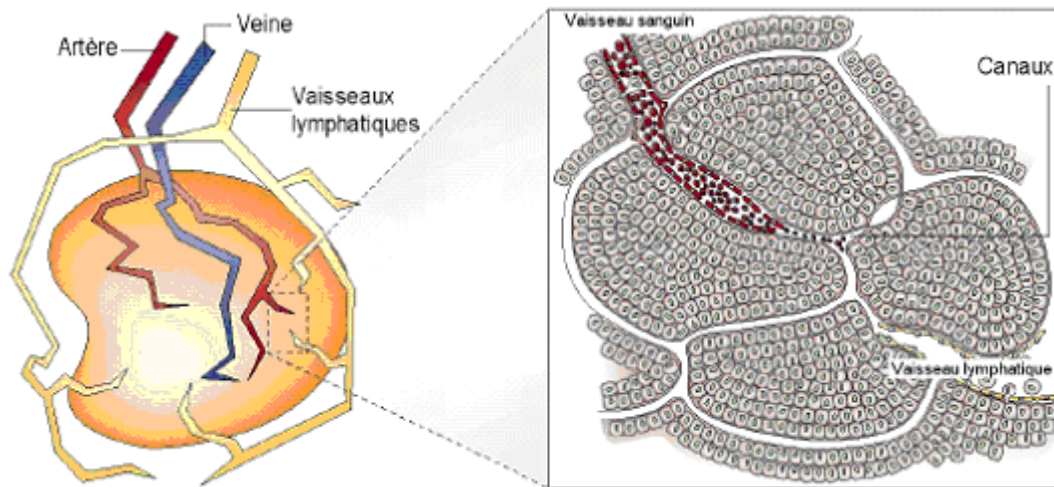


Figure 5 : Les vaisseaux sanguins (artères en rouge, veines en bleu) et les vaisseaux lymphatiques (en jaune) sont présents dans la tumeur. L'hypothèse d'une connexion de canaux construits par les cellules cancéreuses avec la circulation lymphatique et sanguine est représentée dans le cadre de droite. D'après Ruoslahti [111].

L'angiogénèse tumorale constitue à l'heure actuelle un des thèmes majeurs de recherche en cancérologie. L'angiogénèse tumorale est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants sous l'influence, directe ou indirecte, d'un foyer tumoral. Une tumeur maligne ne peut dépasser quelques millimètres de diamètre si elle n'est pas capable d'induire la formation de nouveaux vaisseaux susceptibles de lui apporter l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance. Plusieurs travaux soulignent l'importance de l'angiogénèse dans la croissance tumorale, l'invasion loco-régionale et la dissémination métastatique [112, 113]. La première phase de croissance est strictement *in situ*. La tumeur subsiste en effet sans nécessiter d'angiogénèse en profitant de l'apport vasculaire présent dans le tissu où elle se développe. L'acquisition d'un pouvoir angiogénique par la tumeur, ou par un clone intra-tumoral, lui confère un avantage de croissance qui lui permettra de devenir localement invasive et secondairement facilitera sa dissémination métastatique. Jusqu'alors, dans sa phase « pré-vasculaire », la tumeur dépasse rarement 2 à 3 mm de diamètre et reste habituellement asymptomatique. Cette phase pré-vasculaire peut durer de quelques mois à plusieurs années [9]. L'acquisition d'un pouvoir angiogénique est donc une condition nécessaire pour le passage au stade invasif. Ce «switch» angiogénique tumoral traduisant un déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques peut être expliqué de 2 façons :

- par un mécanisme adaptatif de la tumeur à un environnement défavorable. La synthèse et la sécrétion de nombreux facteurs angiogéniques dont le VEGF (Vascular endothelial growth factor) sont en effet stimulés par l'hypoxie [114]. L'hypoxie induit l'expression d'une protéine HIF-1 (*Hypoxia Inductible Factor*) et favorise la synthèse et la sécrétion de VEGF [115]. Le stimulus peut être également d'origine inflammatoire ou tumoral.

- par un mécanisme génétiquement déterminé. Dans les adénocarcinomes coliques il existe un lien étroit entre mutations de la p53, synthèse de VEGF et angiogénèse [116, 117]. Les tumeurs présentant des mutations du gène p53 ont des taux moyens d'ARNm du VEGF plus élevés et une densité vasculaire plus importante que les tumeurs dépourvues de mutation. Dans les cancers du tube digestif la densité en microvaisseaux est un facteur pronostique de rechute essentiellement métastatique [118]. Cependant, la standardisation des méthodes de quantification de l'angiogénèse est difficile et la valeur pronostique du VEGF a été parfois discutée [119]. Ceci explique que la densité en microvaisseaux et le VEGF ne sont pas des facteurs pronostiques utilisés en pratique courante. Lors de leur prolifération et de leur migration invasive, la réplication des cellules endothéliales s'accélère d'un facteur mille. Ces cellules migrent alors très vite vers leur source chimiotactique et les éléments qui favorisent la migration cellulaire sont tous mobilisés. On note en particulier une sécrétion abondante de protéases qui détruisent la membrane basale et le tissu conjonctif environnant ainsi qu'une adhésion dynamique qui remplace une adhésion statique [120]. En dehors des intégrines et notamment de l'intégrine $\alpha\beta3$, les molécules d'adhésion impliquées dans l'angiogénèse tumorale sont peu connues [121]. Pendant la dernière étape, les cellules endothéliales s'organisent en tubes qui s'anastomosent pour former des boucles. La lumière vasculaire s'organise avec acquisition d'une membrane basale fragmentée et recrutement des péricytes, ce qui permet de former une structure adaptée à la circulation du flux sanguin. Pour la plupart des capillaires, l'évolution s'arrête à ce stade. Une minorité d'entre eux continuent à évoluer pour accroître le diamètre de leur lumière et, en même temps, augmenter l'épaisseur de leur paroi. Certains facteurs clés sont indispensables à cette phase, comme l'angiopoïétine-1 qui se lie à son récepteur Tie2, le TGF β et le PDGF [122]. Deux facteurs sont déterminants dans l'angiogénèse : la balance entre les molécules diffusibles angiogéniques et anti-angiogéniques, et la qualité d'ancrage des cellules endothéliales à leur environnement. Bien que les cellules endothéliales soient capables de sécréter leurs propres facteurs de croissance, la plupart des régulateurs de l'angiogénèse sont produits par différents types cellulaires de l'environnement tels que les leucocytes, les fibroblastes, les plaquettes ou encore les cellules tumorales indiquant que l'angiogénèse est à la fois sous contrôle autocrine et paracrine.

IV. 3. 1. Les canaux « Vasculogenic mimicry » ou pseudo-vaisseaux tumoraux

Les premières observations de cellules cancéreuses dans la paroi de vaisseaux ont été initialement faites dans les années 60. Cette idée a ressurgi de manière assez retentissante, lors des travaux de Maniotis et al. qui, en 1999, a montré que les vaisseaux des mélanomes malins invasifs n'étaient pas constitués de cellules endothéliales, mais creusés au sein des cellules cancéreuses. La microscopie électronique utilisée révèle que ces vaisseaux sont délimités par une couche de matrice extracellulaire, donnant l'apparence d'une basale. Aucune cellule ou noyau n'ont été détectés dans la lumière. Sur la face externe de cette membrane basale, on retrouve des cellules tumorales gainant ces canaux creusés dans la matrice extracellulaire. Pour les auteurs, la pénurie de vaisseaux sanguins, mise en évidence par la négativité des marqueurs de cellules endothéliales, ainsi que la présence d'hématies dans ces canaux matriciels formés par les cellules cancéreuses, laissent supposer que ces derniers pourraient fournir une solution alternative de circulation sanguine pour la tumeur [123].

Dans d'autres localisations tumorales, des structures canalaire particulières ont également été observées. Ainsi Chang et al. ont montré que 15 % des vaisseaux des carcinomes du côlon humain qu'ils ont étudiés étaient des vaisseaux mosaïques, constitués de cellules cancéreuses et endothéliales [124].

L'observation de ces structures est corrélée au mauvais pronostic de ces tumeurs [125].

En revanche, McDonald et Foss font remarquer que les vaisseaux tumoraux étant anormaux, l'absence de certains marqueurs n'indiquerait pas pour autant que les cellules endothéliales ne soient pas présentes. La difficulté d'identification des cellules endothéliales pourrait apporter une certaine confusion dans les observations réalisées. Il est sans doute nécessaire d'utiliser de multiples marqueurs, pour répondre à ce problème. Enfin, l'observation au microscope photonique reste trop limitée, car certains endothéliums sont tellement fins qu'ils n'apparaissent pas à cette échelle et ceci laisse supposer que ce sont les cellules cancéreuses qui sont au contact de la matrice protéique du canal sanguin.

L'autre difficulté, lorsque la présence de ces structures est bien identifiée, est de savoir si ces canaux sont réellement fonctionnels. La présence d'hématies ne constitue pas une preuve, car il est fréquent d'observer des hémorragies intra-tumorales, en partie dues au fait que les capillaires en croissance ne sont pas complètement fermés [111, 126].

L'existence de cette forme de vaisseaux dans la tumeur reste pour l'instant très controversée, chacun des protagonistes apportant des arguments supposés être de plus en plus convaincants, en se basant sur des études en microscopie confocale et électronique, sans toutefois nous permettre de conclure sur la réalité de ce phénomène.

IV. 3. 2. Les vaisseaux lymphatiques

Les vaisseaux lymphatiques collectent les fluides, les macromolécules et les cellules immunitaires qui se sont extravasés du sang vers le tissu. Ce sont des structures dont l'origine est un « cul de sac », qui drainent la lymphe vers le système veineux par l'intermédiaire de la grande veine lymphatique et du canal thoracique. Les capillaires lymphatiques se distinguent des capillaires sanguins par leur calibre plus important et plus irrégulier, leurs cellules endothéliales moins cohésives et leur basale discontinue. Ils sont une voie importante de passage des cellules cancéreuses permettant la formation de métastases. Beaucoup de cancers, comme celui du sein ou de la prostate, diffusent de façon préférentielle à travers le réseau lymphatique. On a longtemps supposé que les cellules accédaient au système lymphatique par une invasion des vaisseaux se trouvant à proximité de la tumeur. Toutefois, la découverte de marqueurs spécifiques a permis de montrer qu'au moins un certain nombre de tumeurs contenait des vaisseaux lymphatiques [127]. De récents travaux semblent indiquer que l'évaluation du nombre et peut-être de la taille des vaisseaux lymphatiques, dans la tumeur ou autour d'elle, est importante pour déterminer sa capacité à métastaser [128]. Lorsqu'ils ne sont pas fonctionnels dans les tumeurs, ils pourraient contribuer à une hypertension interstitielle et interférer avec la diffusion des agents thérapeutiques [129].

IV. 3. 3. Les vaisseaux sanguins

Le système vasculaire sanguin est constitué de trois différents types de vaisseaux : les artères, les veines et les capillaires (Figure 6) [130].

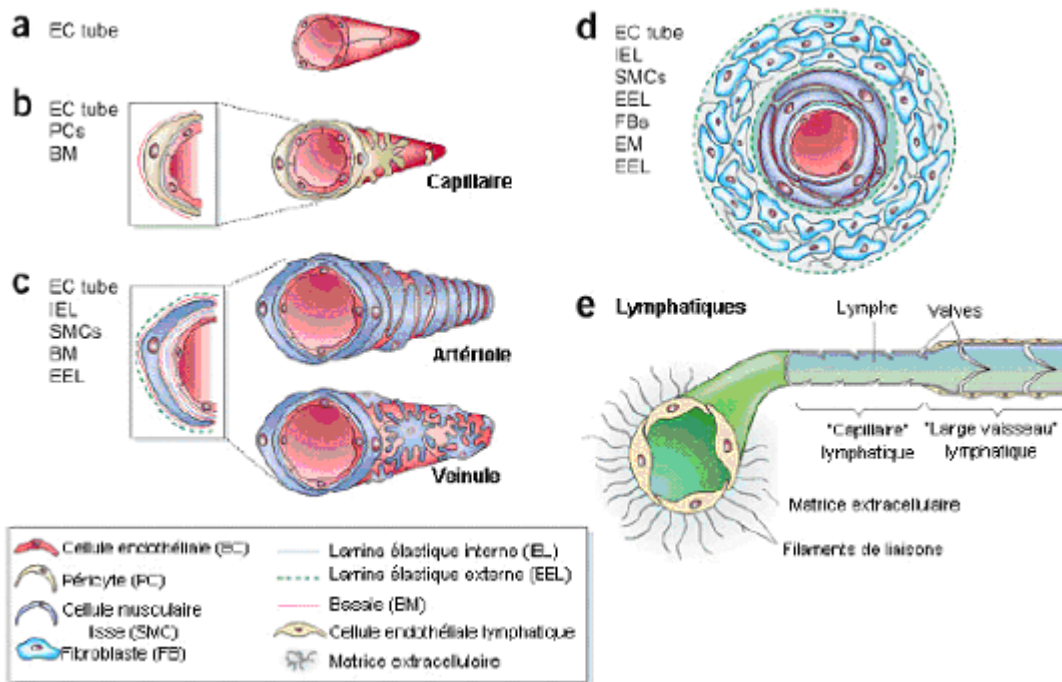


Figure 6 : Structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques. (a-d) Vaisseaux sanguins. (e) Vaisseaux lymphatiques. (a) Vaisseau natif constitué seulement de cellules endothéliales. (b) Capillaire, le plus abondant des vaisseaux dans le corps humain. Il est constitué de cellules endothéliales riches en vésicules de pinocytose entourées d'une basale dans laquelle est incluse une couche clairsemée de péricytes présentant des myofibrilles. Selon les organes ou les tissus, la paroi du capillaire est continue (muscle), fenêtrée (rein, glandes endocrines) ou discontinue (foie). Les capillaires du cerveau et de la rétine plus spécialisés comportent des « tight junctions » et sont imperméables à de nombreuses molécules. (c) Artérioles et veinules ont une paroi beaucoup plus importante que les capillaires en raison de la présence de couches matricielles élastiques et de cellules musculaires lisses. (d) Les parois des gros vaisseaux sont constituées de 3 couches spécialisées, l'intima, la media et l'adventice. (e) Les canaux lymphatiques ne possèdent pas de péricyte mais des cellules endothéliales en manchon plus ou moins continu, associées au tissu grâce à des filaments d'accrochage et des fragments de basale. Les gros vaisseaux possèdent une basale continue et des valves à l'intérieur du canal déterminants le sens du flux lymphatique. D'après Jain [130].

Les artères comprennent trois tuniques : une externe (ou adventice) faite de tissu conjonctif riche en fibres, une moyenne (ou média) musculo-élastique et une tunique interne (ou intima) constituée par l'endothélium reposant sur une fine couche conjonctive. Les veines sont également constituées de trois tuniques mais leur paroi est beaucoup moins riche en cellules musculaires lisses et leur lumière souvent collabée. Enfin, les capillaires sont des vaisseaux sanguins de très petit calibre comprenant seulement deux tuniques faites de cellules endothéliales et de cellules péricytaire.

Ils sont essentiellement de trois types : continus, discontinus et fenêtrés. Les capillaires constituent la seule zone d'échange permettant le passage des gaz (CO₂ et O₂), des nutriments et des déchets tissulaires.

La vascularisation des tumeurs est établie par vasculogénèse, intussusception ou angiogénèse (Figure 7).

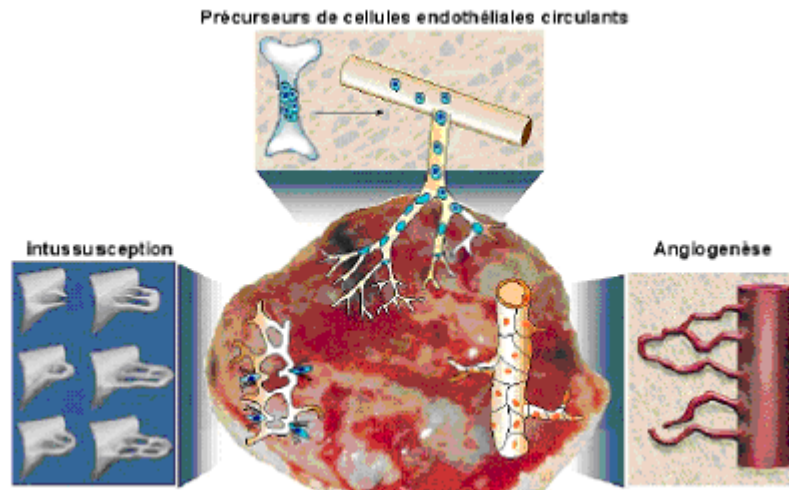


Figure 7 : Mécanismes de vascularisation d'un tissu. L'organe peut être vascularisé par un bourgeonnement (angiogénèse) ou par division de vaisseaux préexistants (intussusception) ou par établissement de nouveaux vaisseaux à partir de cellules souches provenant de la moelle osseuse (vasculogénèse). D'après Carmeliet [129].

La vasculogénèse est un phénomène qui, dans les conditions physiologiques, a lieu principalement au cours de l'embryogénèse, lors de la formation des principaux axes de circulation comme les vaisseaux du poumon, du cerveau et de l'intestin. Ces vaisseaux sont formés à partir de précurseurs, les angioblastes.

On a longtemps supposé qu'à l'âge adulte ce processus n'existait plus, jusqu'à la découverte récente de précurseurs de cellules endothéliales circulantes [131].

Ces dernières sont connues sous le terme de « Bone marrow-derived endothelial precursors » ou « hematopoietic Stem Cells ». On attribue une partie de la vascularisation tumorale à ces cellules qui seraient recrutées par la tumeur [132].

L'angiogénèse est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Elle peut être morphologiquement décrite en 3 étapes successives : le bourgeonnement qui correspond à l'apparition de petites masses de cellules endothéliales sur la face externe des vaisseaux. Elles sont d'abord pleines puis se creusent rapidement, formant une lumière qui se termine en « cul de sac ». La migration constitue l'étape suivante,

elle correspond à la croissance de ces bourgeons. Enfin, l'organisation est la phase de reconstitution d'un réseau capillaire, au contact et à l'intérieur du foyer tumoral [133].

IV. 4. Physiopathologie de la dissémination métastatique

La métastase et l'invasion locale caractérisent les cellules des tumeurs malignes. La métastase est définie par la capacité des cellules tumorales à migrer, à s'implanter dans un site distant puis à proliférer, et l'invasion par la capacité des cellules tumorales à infiltrer les tissus avoisinants. Les cellules cancéreuses partagent ces capacités à quitter leur tissu d'origine avec quelques types cellulaires non tumoraux (migration de lymphocytes vers le thymus chez l'embryon, prolifération de cellules lympho-monocytaires dans les ganglions chez l'adulte lors d'une réaction immunitaire, ou au décours d'un avortement lors de l'échappement de cellules trophoblastiques). Cependant, ces événements physiologiques ou physiopathologiques qui aboutissent à la prolifération de cellules dans des sites particuliers obéissent à des signaux d'arrêt du cycle cellulaire, liés le plus souvent à la différenciation (ou à l'apoptose) des cellules concernées. Les cellules tumorales échappent à ces contrôles et prolifèrent dans les organes atteints, formant des foyers secondaires, souvent multiples. Les cellules métastatiques franchissent des étapes successives :

1. Formation de néovaisseaux dans la tumeur primitive, migration et échappement de cellules dans la circulation sanguine ou lymphatique ;
2. Étape de transport sanguin ou lymphatique ;
3. Interactions avec les éléments sanguins ou lymphatiques ;
4. Entrée dans les capillaires et contact avec un support endothélial ; prolifération dans le tissu cible et constitution d'un écosystème.

L'évolution d'une tumeur solide maligne telle qu'elle peut être reconstruite à partir de l'évolution clinique semble passer par de multiples étapes. Le modèle de Fearon et Vogelstein [134] concerne la transformation de la cellule normale en cellule tumorale proliférant localement. Celle-ci est curable grâce à un traitement loco-régional. Mais le modèle de Fearon et Vogelstein n'explique pas la transition de l'état de tumeur primitive à celui de tumeur métastatique. Les cellules tumorales de petites tumeurs sont rarement métastatiques, alors que les tumeurs de taille plus grande le sont, suggérant que cette caractéristique est acquise au cours de la croissance de la tumeur. Transformation puis acquisition de la capacité à métastaser, pourraient être liées à des événements génétiques différents, l'évènement initial facilitant les évènements secondaires.

La transition entre tumeur maligne non métastatique et métastatique nécessite un changement dans la biologie des cellules qui implique trois ordres de faits : a) une mutation (ou évènement) génétique, b) l'acquisition de propriétés cellulaires nouvelles, c) la constitution d'un écosystème, permettant l'implantation des cellules tumorales.

La capacité métastatique apparaît spontanément dans une population de cellules tumorales. Le rôle d'oncogènes dans l'acquisition du potentiel métastatique est discuté dans les tumeurs humaines [135] mais a pu être mis en évidence dans des modèles expérimentaux. La nature génétique du potentiel métastatique a été démontrée par les travaux de Hill [136]. Cette démonstration a été faite en utilisant l'analyse de fluctuation décrite par Luria et Delbrück [137]. Elle est fondée sur le principe suivant : on recherche l'émergence d'un évènement génétique spontané en partant de clones issus d'une population de cellules tumorales, au cours des divisions cellulaires successives. L'évènement génétique (ici l'acquisition du potentiel métastatique) se produit spontanément au cours des divisions cellulaires des clones individuels : il apparaît tôt ou tard (c'est à dire au hasard), définissant une variabilité de fréquence de l'évènement dans la descendance des cellules, lorsqu'elles sont testées simultanément. Lorsqu'on laisse proliférer les clones, tous finiront par acquérir un potentiel métastatique. Hill a pu ainsi montrer que l'acquisition de la capacité métastatique est déterminée de la même manière qu'une mutation génétique, et que cet évènement était relativement fréquent, avec un taux de mutation élevé (de 10^{-4} à 10^{-5}). Cependant cet évènement génétique ne correspond pas à une mutation ponctuelle de l'ADN, dont la fréquence est plus faible, de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-9} . Hill notait également que les taux de mutations spontanées des lignées métastatiques étaient plus élevés que ceux des lignées non métastatiques. Cette démonstration conduit à une conclusion intéressante pour le clinicien : statistiquement, pour un type de cancer donné, plus une tumeur primitive est de grande taille, plus elle a de chance d'avoir généré des variants métastatiques. Par contre, une petite tumeur peut encore être localisée. Ce modèle explique également l'hétérogénéité des cellules vis à vis de nombreux caractères y compris le potentiel métastatique [138].

Ce modèle d'évolution par mutation est similaire à celui décrit par Goldie et Coldman quant à l'apparition de variants chimiorésistants, également liés à des mutations [139].

La combinaison de gènes régie par le « phénotype métastatique » inclut la capacité à former une néoangiogénèse, quitter la tumeur primitive, à migrer, à survivre dans la circulation, à interagir avec les cellules endothéliales, à résister au système immunitaire, à tirer profit des facteurs de croissance pour proliférer et former un nouveau foyer tumoral. La cellule métastatique doit exprimer l'ensemble de ces caractéristiques, ce qui explique que seul un petit nombre de cellules tumorales sont métastatiques (1 pour 10^4 à pour 10^5 cellules) [140]. L'analyse génétique n'a pas permis à ce jour d'isoler des gènes de métastase. Actuellement, on admet que l'acquisition d'un potentiel métastatique résulte d'une combinaison

d'expression de gènes nombreux et différents, dans un contexte d'accumulations de changements génétiques et cellulaires divers. Cette hypothèse rend compte de la diversité des gènes activés au cours du processus métastatique, de la nécessité que plusieurs s'expriment simultanément, et qu'enfin il suffise d'un seul changement pour qu'une combinaison presque complète initie la transition métastatique. Le gène nm23 suppresseur de métastases a été isolé à partir de tumeurs non métastatiques [141]. Son expression est inversement proportionnelle au potentiel métastatique de tumeur du sein [142]. Des travaux récents ont cependant remis en question son importance dans le potentiel métastatique des tumeurs colorectales [143].

Des résultats récents indiquent qu'un dérèglement du gène *Six1* est associé à certains types de cancers métastatiques (cancer du sein, tumeur de Wilms et rhabdomyosarcome) [144-146]. Ce gène pourrait non seulement contrôler la prolifération cellulaire, mais aussi participer à l'acquisition des propriétés invasives des cellules cancéreuses.

La cyclo-oxygénase 2 (cox2) est une glycoprotéine membranaire induite par un ensemble d'agents pro-inflammatoires, de cytokines, de facteurs de croissance et d'oncogènes. Elle est exprimée pendant les phases précoces de la cancérogenèse colorectale, dès le stade d'adénome et favorise la prolifération des cellules tumorales, leur résistance contre l'apoptose, l'angiogénèse, l'invasion et la mise en place du processus métastatique [147]. Le niveau de Cox2 dans les carcinomes coliques est d'autant plus élevé que la tumeur est de grande taille et agressive. Cox2 est associée aux propriétés invasives et métastatiques des cellules tumorales [148]. Cox2 augmente l'adhésion des cellules tumorales :

- à la matrice extracellulaire, en diminuant l'expression des E-cadhérines, un gène suppresseur de tumeurs impliqué dans les contacts cellule-cellule [149]
- aux cellules endothéliales via les E-Sélectines, favorisant ainsi le passage des cellules tumorales vers la circulation sanguine et donc les métastases hépatiques [150].

La perte d'adhésion intercellulaire est une étape également nécessaire. La E-cadhérine est le prototype des molécules d'adhésion des épithéliums [151, 152]. C'est une molécule transmembranaire qui, en présence de calcium, se lie à une structure identique présentée par la cellule voisine. La perte de fonction de la E-cadhérine est observée dans les tumeurs agressives. Une preuve directe de son rôle dans la métastase a été de faire exprimer la E-cadhérine par transfection de cellules déficientes en E-cadhérine et métastatiques. Le résultat fut que ces cellules avaient perdu leur potentiel métastatique [153]. La E-cadhérine appartient à une classe de molécules, les "CAM", *cell adhesion molecules*, qui peuvent jouer un rôle similaire, selon les types de tumeurs concernées. Elles interagissent avec les caténines a et b, dont la phosphorylation contrôlent le niveau de cohésion. Ainsi, une

phosphorylation anormalement élevée de la b-caténine a été retrouvée dans des cancers invasifs du côlon [154]. Une interaction fonctionnelle entre le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) et la phosphorylation de la b-caténine a également été mise en évidence par ce même groupe. La libération des cellules tumorales est liée à la perte des connections intercellulaires homotypiques mais aussi à la synthèse d'enzymes permettant la lyse de la matrice extracellulaire de soutien, ce qui favorise l'isolement cellulaire. De nombreuses enzymes ont été identifiées et corrélées au potentiel métastatique des cellules tumorales. Certaines de ces enzymes sont synthétisées par les cellules tumorales, telles les métalloprotéases dont les collagénases, les cathepsines, ou les glycosidases. D'autres sont synthétisées par des cellules normales de l'hôte, peut-être sous l'influence des cellules tumorales, telle la stromelysine 3 [155]. Ces enzymes libérées dans le milieu extracellulaire, se lient à des récepteurs présents sur les cellules tumorales invasives et cette liaison déclenche la réaction de lyse. Si ces enzymes sont relativement spécifiques d'un substrat (la collagénase attaque spécifiquement le collagène), leur activation génère l'activation d'autres enzymes au contact du point de lyse. La capacité de dégradation enzymatique dépend également d'un équilibre entre ces enzymes et leurs inhibiteurs tels les TIMPs (tumor inhibitor metallo proteases). La mesure ou la présence de tels déterminants moléculaires (enzymes et inhibiteurs) constitue des marqueurs pronostiques de potentiel métastatique. La migration des cellules invasives est stimulée par de nombreux facteurs libérés au cours de la dégradation enzymatique. Le scatter factor a été isolé à partir de culture de cellules, dont il induisait la dispersion. Il se lie à un récepteur membranaire, qui est lui-même le produit de l'oncogène *CMET* [156]. Le tumor necrosis factor- α (TNF- α) est aussi un facteur de motilité de cellules tumorales. Il interagit avec un récepteur spécifique. Les facteurs de croissance dits fibroblastiques (FGF) qui sont synthétisés par de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales, ont également des effets dispersants, mobilisant les cellules et les rendant invasives [157].

La présence dans la circulation sanguine ou lymphatique de cellules tumorales a été démontrée [28, 30, 158, 159]. Elle nécessite que les cellules tumorales aient préalablement atteint un lit vasculaire ou lymphatique. Ceci est possible lorsque la tumeur primitive développe une néoangiogénèse.

Ces étapes ont été bien décrites dans le cas des mélanomes : leur pronostic dépend de la taille de la tumeur primitive (extension en profondeur dans la peau), elle-même contrôlant le seuil de formation d'une néovascularisation. Des facteurs angiogéniques sont produits par certaines cellules tumorales, attirant et différenciant des cellules endothéliales en microvaisseaux. Des facteurs antiangiogéniques telle l'angiostatine, ont également été décrits.

Si de nombreuses cellules tumorales circulent, leur viabilité et leur capacité à proliférer sont souvent limitées [160]. Adaptées à une croissance au contact d'un substrat, ces cellules ne prolifèrent pas en suspension. Leur survie dépend de leur capacité à résister aux agressions mécaniques : chocs dus à la pression sanguine, élongation et friction dans les capillaires. Ainsi, seule une partie des cellules tumorales survit à ce type de conditions. Ces cellules résistantes montrent un potentiel métastatique élevé. L'agrégation plaquettaire est parfois induite au contact des cellules tumorales, ce qui pourrait d'une part les protéger des agressions mécaniques, permettre une adhésion aux parois des vaisseaux et les isoler de la toxicité des cellules lymphocytaires NK (*Natural Killer*). En effet c'est à ce moment que ces lymphocytes peuvent intervenir pour lyser ces cellules reconnues comme anormales et anormalement présentes dans le compartiment sanguin. Il semble que les cellules métastatiques soient sensibles à la toxicité NK [161]. La stimulation du système immunitaire par des cytokines tel l'interféron, réduit leur capacité à former des métastases. L'adhésion des cellules dans l'organe métastasé se fait dès qu'il y a ralentissement du flux sanguin, permettant aux cellules d'approcher un substrat, le plus souvent dans un vaisseau capillaire sanguin. Deux types de substrats sont alors accessibles : les cellules endothéliales et la membrane basale sous-jacente. L'adhésion hétérotypique est réalisée grâce à des structures moléculaires présentes sur l'une des 2 cellules, l'autre présentant le récepteur. Par exemple un haut niveau d'expression (ou une altération d'expression) de CD44, une glycoprotéine de surface, a été mis en évidence sur des cellules coliques malignes [162]. L'expression tumorale de CD44 pourrait être un marqueur pronostique. Il en est de même pour l'ACE (Antigène Carcino Embryonnaire), dont on sait qu'il est impliqué dans la formation des métastases hépatiques. L'adhésion sur un substrat acellulaire nécessite l'expression d'une molécule qui a une affinité pour un des composants du substrat, telle des intégrines qui interagissent avec la laminine, la fibronectine ou la vitronectine, constituants des membranes basales. Les lectines peuvent également servir de molécules d'adhésion, l'interaction entre les résidus sucrés, notamment le galactose, permettant une reconnaissance entre les structures.

V. L'angiogénèse comme cible thérapeutique dans le CCR

La compréhension des mécanismes de l'angiogénèse tumorale a permis la mise au point de nouvelles stratégies anti-tumorales fondées sur l'inhibition du processus angiogénique.

L'inhibition de la formation du réseau vasculaire inhibe la croissance tumorale et diminue les risques de dissémination métastatique.

Le développement dans la cellule cancéreuse de mécanismes de résistance aux agents cytotoxiques est la principale cause d'échec des chimiothérapies classiques (résistances

intrinsèques ou acquises). La potentialité des cellules cancéreuses à échapper aux traitements cytotoxiques résulte notamment de leur instabilité génique (translocation chromosomique, amplification génique) qui conduit à la sélection de sous-populations de cellules tumorales réfractaires à la chimiothérapie. Il apparaît qu'une stratégie thérapeutique ciblant les cellules endothéliales (cellules normales diploïdes), pourrait permettre d'assurer le contrôle de l'évolution de la maladie. Les thérapeutiques anti-angiogéniques dirigées contre les cellules endothéliales avaient la réputation d'induire peu ou pas de résistance [163, 164]. Des études récentes ont nuancé cette notion en rapportant des modifications du génotype des cellules de la vascularisation tumorale strictement dépendante de la tumeur [165, 166]. De nombreuses molécules inhibant les facteurs angiogéniques ont été développées au cours des dernières années lors d'essais précliniques (phase II et III). L'identification du VEGF comme acteur moléculaire des angiogénèses rétinienne et tumorales a amorcé la recherche de nouvelles molécules anti-VEGF (Ac anti VEGF-R2, SU 5416, Interféron...). Les traitements anti-angiogéniques ont été bien tolérés et l'étude américaine de phase I conduite entre 1991 et 2002 n'a pas montré de décès directement lié à une toxicité médicamenteuse chez 402 patients traités en monothérapie par un agent anti-angiogénique [167].

V. 1. Classification et mécanismes d'action des médicaments antiangiogéniques

Les 2 cibles principales des médicaments antiangiogéniques sont d'une part l'inhibition de la biodisponibilité des facteurs angiogéniques relargués par la cellule cancéreuse, d'autre part la destruction des cellules endothéliales intratumorales.

Les tentatives de classification des agents anti-angiogéniques se sont heurtées à la multitude et la complexité des mécanismes d'anti-angiogénèse. La quantification de l'angiogénèse dans les modèles expérimentaux est en effet difficile et peu reproductible. Des molécules anti-cancéreuses sans effet connu sur l'angiogénèse, se sont finalement révélées anti-angiogéniques (Bay 43-9006 ou Sorafenib, Docetaxel, Irinotecan...). Il semble raisonnable d'attribuer des propriétés antiangiogéniques à une molécule lorsqu'elle développe des effets toxiques sur les vaisseaux à une dose plus faible que la dose cytotoxique [168-170]. Malgré ces difficultés, une classification des molécules anti-angiogéniques a récemment été proposée en se basant sur les cibles et les mécanismes d'action [171].

Trois catégories ont été individualisées :

1. Les anti-angiogéniques directs (angiostatine, endostatine, thalidomide...) : qui ciblent les cellules endothéliales et inhibent leurs fonctions dans la prolifération, la migration et le développement de néo-vaisseaux.

2. Les anti-angiogéniques indirects (cetuximab, marimastat, gefitinib, erlotinib...) : qui s'opposent à la production de facteurs angiogéniques par la tumeur, le stroma tumoral et les cellules inflammatoires péri-tumorales. L'isoleucine, un acide aminé essentiel, a récemment montré des propriétés antitumorale anti-angiogénique en inhibant la production de VEGF dans un modèle murin de MH d'origine colorectale [172].

3. Les anti-angiogéniques mixtes (bevacizumab, SU 11248 ou sunitinib...) : qui ciblent à la fois les cellules endothéliales et les cellules tumorales.

Concernant la destruction des cellules endothéliales intratumorales, 2 voies principales ont été développées :

- L'inhibition de la dissémination des cellules endothéliales : Des composés chimiques inhibant la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogénèse tumorale *in vivo* ont été synthétisés. A titre d'exemple, des inhibiteurs des métalloprotéases (MMP) de spécificité plus ou moins étroite pour la métalloprotéinase MMP II ont été testés en phase III (Marimastat, Bay 12-9566, AG 3340...). Les résultats de ces études n'ont pas confirmé les espoirs attendus [173-175]. D'autres composés s'adressent aux intégrines qui seraient spécifiquement exprimées par l'endothélium tumoral.

Un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine, v-3 (Vitaxin), marqueur spécifiquement exprimé par la cellule endothéliale est en cours d'étude [176]. Les premiers résultats d'une étude de phase II a montré une augmentation de la survie de patients porteurs de mélanomes métastatiques sans augmentations des effets indésirables [177].

- La destruction sélective des cellules endothéliales intratumorales : Dans la classe des agents détruisant les vaisseaux tumoraux on trouve de nombreux composés dont les mécanismes d'action restent souvent à élucider et surtout dont la spécificité pour les seules cellules qui ont acquis un phénotype angiogénique n'est pas fermement établie. Citons le Néovastat[®], la fumagilline, et un dérivé de paroi de staphylocoque CM101. Par ailleurs, l'action anti-angiogénique de certains médicaments utilisés pour d'autres affections est en cours d'évaluation (tamoxifène, penicillamine ...).

La notion que l'exérèse de la tumeur primitive provoque dans certains cas l'éclosion de métastases dormantes a conduit l'équipe de Folkman à rechercher des inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales dans le sang et l'urine d'animaux portant des xénogreffes de tumeurs implantées sous la peau. Il a ainsi été purifié une molécule anti-angiogénique qui, à la différence des facteurs angiogéniques, est circulante et donc capable d'inhiber à distance de son lieu de synthèse l'angiogénèse nécessaire au développement des métastases, l'angiostatine [178].

Ces auteurs ont montré que l'angiostatine n'inhibait pas la multiplication des cellules cancéreuses mais induisait leur apoptose avec une intensité proportionnelle à leur taux de prolifération. D'autres inhibiteurs de l'angiogénèse comme l'endostatine ont été découverts. Des toxines ont été vectorisées sur les seules cellules endothéliales intratumorales tout en épargnant les cellules endothéliales quiescentes. Un anticorps bispécifique dirigé contre l'antigène MHC de classe II spécifiquement exprimé par l'endothélium tumoral et dirigé aussi contre le facteur tissulaire permet d'obtenir une thrombose des vaisseaux tumoraux [179]. Ainsi, de nombreuses étapes du processus angiogénique ont servi de cibles pour la mise au point de stratégies anti-angiogéniques [180]. Plus de cent essais cliniques par différents traitements anti-angiogéniques sont en cours. Parmi ceux-ci, 8 concernent spécifiquement le CCR.

V. 2. Les effets indésirables des médicaments antiangiogéniques

L'hypertension artérielle a été l'effet indésirable le plus fréquent avec l'Avastin[®]. D'autres effets indésirables tels qu'une protéinurie, des saignements et des thrombo-embolies artérielles ont été observés. La diarrhée, les nausées, l'hypertension artérielle, une asthénie et des rashes cutanés ont été les principaux effets indésirables décrits avec les anti-VEGF.

V. 2. 1. L'hypertension artérielle

Elle peut survenir dès l'initiation du traitement anti-VEGF et habituellement ne nécessite ni l'arrêt du traitement, ni de modification de posologie. Un traitement anti-hypertenseur oral est le plus souvent suffisant. L'hypertension artérielle a concerné plus de 32 % des patients sous Avastin[®] [103, 104]. Seuls 11 à 16 % des patients ont nécessité l'utilisation de plusieurs anti-hypertenseurs (grade 3) et seulement 1 % ont eu une crise hypertensive maligne mettant en jeu le pronostic vital (grade 4).

La fréquence de l'hypertension artérielle chez les patients sous sunitinib (Sutent[®]) a été de 28 % (dont 6 % de grade 3) dans une étude de phase II sur les carcinomes rénaux métastatiques [181] et de 15 % (dont 4 % de grade 3) dans une étude de phase III sur les GIST (GastroIntestinal Stromal Tumour) [182].

Chez les patients sous sorafenib (Nexavar[®]), la fréquence de l'hypertension artérielle a été de 17 % (dont 3 % de grade 3 ou 4) [183].

Le VEGF favoriserait la production de Nitric Oxyde (NO), puissant vasodilatateur, en augmentant la synthèse de NO synthetase endothéliale.

L'inhibition de la voie du VEGF pourrait inhiber le NO dans la paroi des artérioles et ainsi induire une relative vasoconstriction, une augmentation des résistances périphériques et une élévation de la pression artérielle systémique.

V. 2. 2. La protéinurie

Le rôle du VEGF dans la physiologie rénale a été souligné par plusieurs études [184, 185]. La filtration glomérulaire est assurée par les cellules endothéliales, la membrane basale et les podocytes. Le VEGF qui est exprimé par les podocytes, active le récepteur VEGFR-2 des cellules endothéliales glomérulaires. La destruction ciblée du VEGF des podocytes provoque la perte de fenestration de l'endothélium des capillaires glomérulaires, la prolifération de cellules endothéliales glomérulaires (endotheliosis), la perte des podocytes et une protéinurie chez la souris [184-186].

V. 2. 3. Retard de cicatrisation cutanée

L'angiogénèse est une étape primordiale de la cicatrisation [187]. La cicatrisation a été évaluée chez des patients opérés dans les 60 jours après la dernière dose d'un traitement par bevacizumab ou 28 à 60 jours avant la première dose de bevacizumab dans une étude de phase II et III dans le cancer colorectal [188]. La demi-vie plasmatique du bevacizumab a été de 20 jours environ. Les retards de cicatrisation, les perforations intestinales, les fistules, les abcès et les hémorragies étaient classés comme complications de grade 3 ou 4. Chez les patients ayant déjà reçu du bevacizumab, on a relevé 13 % de complications lorsque la chirurgie été réalisée dans les 60 jours après la dernière dose de bevacizumab (contre seulement 3,4 % après chimiothérapie classique).

Lorsque la chirurgie précédait le traitement par bevacizumab, on a noté 1,3 % de complications (contre 0,5 % avant une chimiothérapie classique).

V. 2. 4. Perforations digestives

Dans une étude de phase III sur le cancer colorectal, on a relevé 1,5 % de perforations digestives dans le bras bevacizumab / Folfiri (*versus* 0 % dans le bras placebo / Folfiri) [103]. La majorité des perforations (68 %) sont survenues dans les 60 jours du traitement par bevacizumab. Ces perforations digestives ont été rares chez les patients sous Nexavar® et Sutent®.

Chez la souris adulte, l'inhibition de la voie du VEGF pendant 2 à 3 semaines a provoqué la diminution de 34 à 46 % des capillaires des villosités intestinales [186]. Ceci, en plus

d'autres facteurs favorisant, a pu intervenir dans la physiopathologie de telles perforations digestives.

Les facteurs favorisant ces perforations ont été : une tumeur primitive en place, une carcinose péritonéale, une diverticulite, une occlusion intestinale, une coloscopie récente, une irradiation abdomino-pelvienne antérieure.

V. 2. 5. Hémorragies et Thromboses

La plus fréquente des hémorragies avec le bevacizumab est l'épistaxis (grade 1). Elle est le plus souvent de résolution spontanée sans intervention médicale. D'autres hémorragies de faible abondance (hémoptysie, hématurie, rectorragie, hémorragies génitales, hémorragies cérébrales) ont été rencontrées dans 26 % des patients recevant du sunitinib pour un cancer rénal métastatique.

Chez les patients recevant du bevacizumab pour un carcinome bronchique non à petites cellules on a noté 9 % d'hémorragies importantes (grade 3 à 5) dont 6 % mortelles [189, 190].

Les patients porteurs de CCR métastatiques sous bevacizumab et chimiothérapie ont eu une incidence plus grande d'hémorragies graves (3 à 9 %) que lors de traitement par chimiothérapie seule [103, 104, 191-193]. Les hémorragies de tous types ont été plus fréquentes chez les patients sous sorafénib (15 %) que sous placebo (8 %). Il n'a pas été noté plus d'hémorragie chez les patients traités par sunitinib (18 %) pour GIST (gastrointestinal stromal tumour) *versus* placebo (17 %).

Le risque de complications thrombo-emboliques artérielles (accident vasculaire cérébral, hémorragie méningée, infarctus du myocarde, angine de poitrine) est également augmenté chez les patients traités par bevacizumab. Ceci concerne essentiellement les patients de plus de 65 ans ou avec des antécédents d'accidents thrombo-emboliques. Ces complications thrombo-emboliques ont été de 4 % chez les patients traités par bevacizumab et chimiothérapie (*versus* 2 % chez les patients sous chimiothérapie seule) [194].

La mortalité associée à ces événements thrombo-emboliques a été de 0,8 % chez les patients traités par bevacizumab et chimiothérapie (*versus* 0,4 % en cas de chimiothérapie seule).

V. 2. 6. Leucoencéphalopathie réversible postérieure

On a signalé chez de rares patients recevant du bevacizumab [195], du sunitinib ou du sorafénib [196] des symptômes évocateurs d'un syndrome de leucoencéphalopathie postérieure réversible, une affection neurologique, grave mais réversible qui associe : crises

épileptiques, céphalées, confusion, troubles visuels ou cécité corticale, avec ou sans hypertension associée.

Ce syndrome peut être réversible s'il est reconnu et traité rapidement. On recommande alors un traitement symptomatique spécifique, y compris la maîtrise de l'hypertension, ainsi que l'arrêt de la molécule anti-angiogénique.

V. 2. 7. Insuffisance cardiaque

De rares patients sous sunitinib (11 à 15 %) ou sorafenib ont présenté une diminution de la fraction d'éjection ventriculaire gauche. Une ischémie myocardique ou un infarctus a été rapporté chez 2,9 % des patients traités par sorafenib dans une étude randomisée de phase III sur les carcinomes rénaux [183, 197].

V. 2. 8. Insuffisance endocrine

. Des stigmates cliniques et biologiques d'hypothyroïdie ont été relevés chez des patients traités par sunitinib pour carcinomes rénaux métastatiques ou GIST [198] et par bevacizumab. On a incriminé dans la physiopathologie de ces hypothyroïdies, la diminution des capillaires autour des follicules thyroïdiens. L'inhibition des récepteurs à VEGF s'accompagne également d'une élévation du taux de TSH, vraisemblablement par rétrocontrôle hypothalamique [186].

. Des souris traitées avec 2 inhibiteurs différents du VEGF ont eu une meilleure tolérance au glucose malgré une réduction de la vascularisation des ilots pancréatiques [186]. Il n'y a pas d'étude en clinique humaine qui rapporte de trouble du métabolisme du glucose chez les patients traités par anti-VEGF.

Lors du congrès français commun de la société française de chirurgie digestive (SFCD) et de l'association française de chirurgie hépatobiliaire et de transplantation hépatique (ACHBT) en décembre 2006, un symposium a réuni plusieurs experts sur le thème « anti-angiogéniques et chirurgie en cancérologie ».

Au cours de cette séance, C. Penna a fait une revue de la littérature sur les problèmes éventuels posés par l'utilisation des anti-angiogéniques en chirurgie colorectale. Le risque de complication nécessitant une chirurgie en urgence (hémorragies, perforations) chez les patients sous traitement anti-angiogénique a été évalué. Il n'y a probablement pas ou peu eu de majoration du risque de complication si le traitement anti-angiogénique était débuté en adjuvant plus de 28 jours après la chirurgie.

Il existe une possible majoration du risque en cas de chirurgie en cours de traitement, même si celui-ci est interrompu depuis plus de 28 jours. Enfin, les complications chirurgicales ont pu survenir tardivement jusqu'à 60 jours après la chirurgie et l'arrêt du traitement.

Dans les hépatectomies, il n'y a pas eu d'effet majeur sur la morbidité post-opératoire si le traitement était interrompu au moins 28 jours avant. De nombreuses questions restent en suspend :

- en cas de chimiothérapie néoadjuvante, la durée maximale d'un traitement par bevacizumab reste à déterminer. Les altérations du parenchyme hépatique non tumoral induite par le bevacizumab sont encore mal connues. De la même façon, l'effet du bevacizumab sur la régénération hépatique est encore mal documenté.
- Le délai à respecter entre l'arrêt du bevacizumab et l'hépatectomie reste à préciser, dans la mesure où la demi-vie du bevacizumab est variable (de 11 à 50 jours). Dans l'avenir, il y aura peut être une place pour la détection du bevacizumab ou du VEGF libre circulant.

Ainsi, les conclusions suivantes ont été proposées (tout en sachant qu'il n'y a que peu de données dans la littérature et que les niveaux de preuve sont faibles) :

- Les traitements anti-angiogéniques ne semblent pas augmenter le risque de complications nécessitant un traitement chirurgical chez un malade non opéré. Cela dit, il existe actuellement une forte pression des oncologues pour réaliser une résection première du cancer primitif afin de pouvoir administrer le bevacizumab avec plus de sûreté. Un essai prospectif (Fédération Francophone de Cancérologie Digestive) comparant dans cette situation un bras chirurgie de la tumeur primitive puis Folfiri +/- bevacizumab à un bras Folfiri +/- bevacizumab seul, devrait permettre de répondre à cette question.
- Il faut attendre au moins 28 jours après une intervention « lourde » ou tant que la plaie n'est pas totalement cicatrisée avant d'instaurer un traitement adjuvant par anti-angiogénique.
- En cas d'intervention programmée, le traitement doit être suspendu et il est recommandé d'attendre 2 ou 3 demi-vies du produit (60 jours pour le bevacizumab). Le risque de complication semble en effet majoré avec des complications chirurgicales parfois tardives.
- Les effets du traitement sur la régénération hépatique et les lésions induites par la chimiothérapie doivent faire l'objet de nouveaux travaux de recherche.

VI. Vers de nouvelles cibles thérapeutiques : hémostasie et facteur tissulaire.

Un lien entre activation de l'hémostasie et évolution du cancer a été suggéré par l'observation de thromboses, en particulier veineuses au cours du cancer (syndrome de Trousseau) [199]. De plus, après un premier accident thromboembolique veineux, le risque de décès des patients avec cancer est 4 à 8 fois plus élevé que celui des patients sans cancer [200]. La différence est surtout importante les deux premières années, puis tend à se réduire. Par ailleurs, les cancers découverts dans l'année qui suit un accident thromboembolique veineux ont également une surmortalité par rapport aux cancers qui ne s'accompagnent pas d'accident thromboembolique [201].

Plusieurs processus relativement évidents peuvent expliquer ce lien entre thrombose et cancer. Tout d'abord les cancers évolutifs s'accompagnent d'un syndrome inflammatoire lui-même inducteur d'une hypercoagulabilité, par le biais d'une augmentation du fibrinogène et de certains facteurs de la coagulation comme le facteur VIII, et d'une thrombocytose. Un autre facteur favorisant des thromboses peut être mécanique, lié à la compression de la tumeur ou des métastases sur des axes vasculaires.

Il a bien été démontré que des signes d'activation de la coagulation sont présents chez plus de 90% des patients cancéreux [202]. Une élévation des D dimères, des complexes thrombine-antithrombine, du fragment 1+2 de la prothrombine est constatée chez les patients avec cancer évolutif. Ces stigmates d'activation semblent de plus avoir une valeur pronostique. Un taux élevé de D dimères a même été démontré comme un facteur prédictif indépendant de mauvais pronostic [203, 204]. Dans le cancer du sein, le taux sanguin des D dimères est corrélé au stade clinique et au statut des ganglions lymphatiques [205]. De même, les D dimères sont plus élevés chez des patients atteints de cancer de la prostate métastasé que dans l'hypertrophie bénigne ou le cancer localisé [206]. Leur taux est également corrélé au stade évolutif dans le CCR [207], et dans le cancer de l'ovaire [208]. Un taux élevé de F1+2 est plus souvent observé dans les tumeurs gynécologiques métastasées [209]. Une étude a montré que les marqueurs d'activation de la coagulation sont plus élevés quand le cancer est évolutif qu'en phase de rémission [210]. Des D dimères élevés sont un facteur de risque péjoratif dans le cancer de l'ovaire [211].

L'ensemble de ces données suggère clairement que l'activation des processus d'hémostasie est plus qu'un épiphénomène de la maladie cancéreuse.

De nombreuses études expérimentales ont démontré que la coagulation et la fibrinolyse jouaient un rôle dans l'angiogénèse tumorale, l'invasion et la croissance tumorale, et la dissémination métastatique [129, 212, 213]. En effet, les cellules tumorales expriment des molécules de surface ou sécrètent des médiateurs susceptibles d'activer la coagulation ou

les plaquettes. Cette activation peut être locale ou systémique, et aboutit globalement à favoriser l'extension de la tumeur ou sa dissémination métastatique.

Un des mécanismes les plus clairs d'activation de la coagulation par les cellules cancéreuses passe par l'expression du FT.

VI. 1. Le facteur tissulaire

Le facteur tissulaire ou CD142, autrefois appelé thromboplastine, thrombokine ou facteur III, est le principal initiateur de la coagulation plasmatique. Sa structure l'apparente à la sous-classe II de la superfamille des récepteurs aux cytokines tels que les récepteurs de l'INF α , β , γ ou de l'IL-10. C'est une glycoprotéine transmembranaire (classée parmi les antigènes leucocytaires sous le cluster CD142) qui, par son rôle de récepteur cellulaire des FVII et VIIa, déclenche la cascade de coagulation.

Par son effet procoagulant, l'expression aberrante de FT joue un rôle important dans le sepsis, l'athérosclérose et aussi dans le cancer. Outre son activité hémostatique, le FT a également un rôle dans l'inflammation, l'angiogénèse, la dissémination métastatique et la migration cellulaire *via* son activation des PARs (Protease Activated Receptors) sur les cellules vasculaires.

VI. 1. 1. Structure du FT

Le FT est une petite glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa synthétisée sous forme d'un propeptide de 295 AA et qui après clivage du peptide signal de 32 AA donne la protéine mature de 263 AA. Le FT comporte une partie extracellulaire (AA 1 à 219), un domaine transmembranaire (AA 220 à 242) et un domaine intracytoplasmique (AA 243 à 263) (Figure 9).

Le domaine extracellulaire est le récepteur du FVII de la coagulation et aussi de sa forme activée (FVIIa). La liaison du FT au FVII entraîne son activation en FVIIa, par rupture d'un pont disulfure dans la molécule FVII.

Le segment transmembranaire, riche en AA hydrophobes, semble cependant indispensable à la liaison du VII au domaine extracellulaire: une molécule de FT soluble privée du domaine transmembranaire est incapable de lier et d'activer le VII [214]. La région intracellulaire située en C-terminal, comporte le résidu Cys 245 qui est liée à un acide gras pour l'ancrage de la protéine à la membrane phospholipidique [215].

Le rôle de la partie intracytoplasmique reste encore mal connu. La fixation du FT au FVIIa entraîne des modifications du calcium intracellulaire et la phosphorylation du résidu Ser 258, ce qui entrainerait l'initiation de la transduction d'un signal intracellulaire, *via* la voie MAP

kinase, aboutissant à un état d'activation et de multiplication cellulaire accrue [216, 217].
Belting et coll. ont récemment démontré que le domaine intracellulaire inhibait l'angiogénèse et la tumorigénèse induite par PAR-2 et que sa phosphorylation levait cette inhibition [218].

Le gène du FT est situé en position 1p21-22 du chromosome 1 [220]. Il est constitué de 12,4 kb et comprend 6 exons séparés par 5 introns (Figure 10).

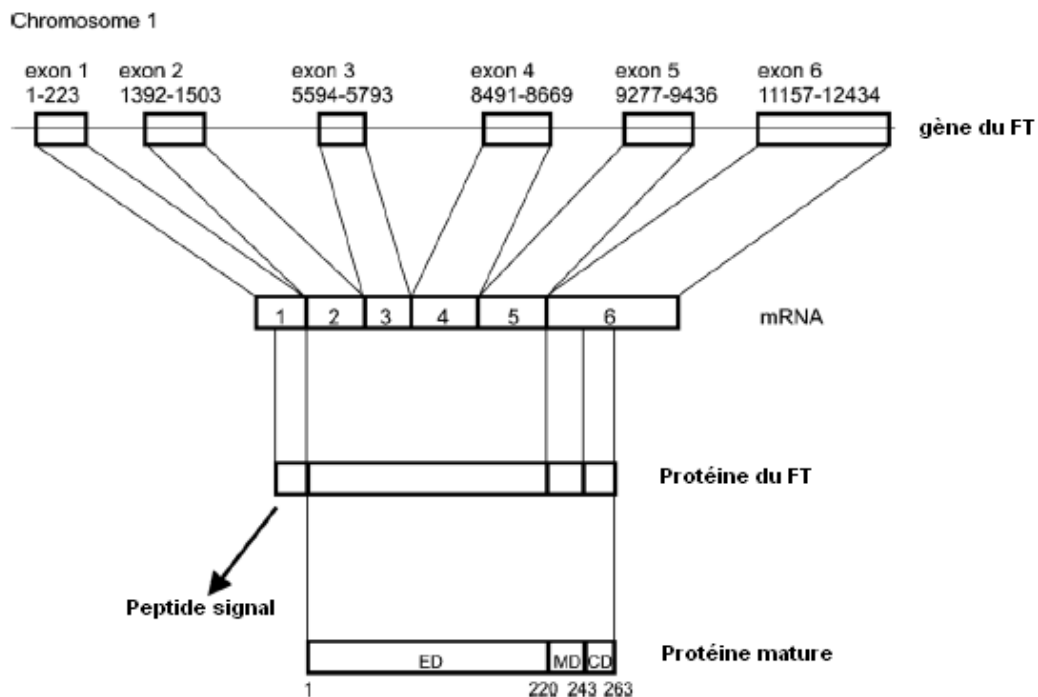


Figure 9 : Représentation schématique du gène (en haut), de l'ARNm et de la protéine (en bas) du FT. La dernière figure représente la protéine mature sans le peptide signal. L'exon 1 code pour le peptide signal et le site d'initiation de la transcription. Les exons 2 à 5 codent pour le domaine extracellulaire (ED). L'exon 6, dont l'extrémité 3' n'est pas traduite, code pour la partie transmembranaire (MD) et intracytoplasmique (CD). D'après Forster [221].

Le promoteur FT comporte un enhancer proximal « Serum Response Region » (SRR) constitué des 3 Egr-1/Sp1 chevauchant et de 2 autres Sp1 permettant une synthèse inductible par le sérum ou les esters de phorbol [222] et un enhancer distal « LPS Responsive Element » (LRE) contenant 2 sites AP-1 et un site NF- κ B. C'est cette région LRE qui permet la réponse des cellules endothéliales et des monocytes à l'endotoxine et aux cytokines [223]. Ces 2 régions SRR et LRE permettent ainsi d'apparenter le gène du FT à ceux de réponse précoce à l'agression (immediate early genes) [224].

L'ARNm du FT, identifié en Northern blot comporte 2 bandes de 2,2 et 3,1 kb. Seul l'ARNm de 2,2 kb code pour une protéine fonctionnelle. L'ARNm du FT a une demi-vie courte [225]. L'altTF, une forme soluble de FT correspondant à un épissage alternatif du gène a été

récemment décrit [226]. Deux nouveaux transcrits ont été récemment caractérisés dans différentes cellules tumorales dont le transcrit alternatif TF-A correspondant à l'insertion de 495pb de l'intron 1 dans l'exon 1. Ce TF-A représente 7 à 10% des transcrits FT des cellules tumorales contre 1% dans les cellules normales [227].

VI. 1. 2. Rôle du FT dans la coagulation

Le FT est un récepteur de très haute affinité pour les FVII et FVIIa. Il a 2 fonctions principales : il est responsable de l'autoactivation du FVII en FVIIa et est le cofacteur du FVIIa pour l'activation des FIX et FX. Ces réactions nécessitent des phospholipides anioniques et du Ca^{2+} .

Le FVII est une glycoprotéine de synthèse hépatique vitamine K dépendante. La forme activée comporte une chaîne légère comprenant le domaine Gla riche en acides glutamiques et des motifs Epidermal Growth Factor (EGF) et une chaîne lourde comprenant le site actif sérine-protéase. La γ -carboxylation oxydative de résidus acide glutamique du domaine Gla donne une charge négative à cette partie de la molécule et permet la fixation de Ca^{2+} nécessaire au changement de conformation favorable alors à la fixation au FT [228]. Cette fixation FVII-FT accélère ainsi la protéolyse entre les résidus Arg152 et Ile153 du FVII.

Le FT permet donc l'autoactivation du FVII. Des traces de FVIIa sont capables d'activer le FVII par protéolyse [229]. Cette réaction est optimale en présence de phospholipides neutres et quand FVII et FVIIa sont liés à des molécules FT distinctes. Le FT recombinant soluble, c'est à dire constitué exclusivement du domaine extracellulaire, est incapable d'induire cette autoactivation [214].

Le FT est également le cofacteur du FVIIa pour l'activation des FIX et FX. Les capacités d'activation catalytique des FIX et FX par le FVIIa isolé sont faibles mais sont considérablement augmentées après fixation du FVIIa sur le FT et en présence de phospholipides anioniques. Il a été démontré que le complexe FT-FVIIa activait plus rapidement le FX que le FIX [230]. Lorsque les FIX et FX sont présents simultanément, l'activation du FIX est augmentée et celle du FX est diminuée [231]. Dès que du FXa est généré, il est rapidement inhibé par le TFPI puis par l'AT. Cependant, les traces de FXa générées sont suffisantes pour la synthèse des premières traces de thrombine.

Le schéma classique de la coagulation comportait 2 voies d'initiation différentes appelées voie endogène et exogène convergeant toutes les 2 sur l'activation du FX en FXa et la génération de thrombine. La voie endogène (initiée par le système contact : facteurs XI, XII, kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et prékallitréine (PK)) et la voie exogène initiée par le FT et le FVII apparaissaient d'égale importance. Mais ce schéma expliquait mal

l'absence de risque hémorragique accrue chez les individus déficitaires en FXII, KHPM ou PK alors que le déficit en FXI restait associé à des manifestations hémorragiques parfois sévères.

La vision actuelle plus dynamique, replace la voie du FT comme principale initiatrice de la coagulation *in vivo* (Figure 11). Le FT est normalement absent du compartiment vasculaire, mais est exprimé par la plupart des tissus extravasculaires de l'organisme, notamment par les tissus d'enveloppe et de soutien. Une place majeure est également donnée aux acteurs cellulaires de la coagulation comme les cellules présentant le FT (cellule endothéliale, CML ou monocyte activés par exemple) ou les plaquettes [232]. La rencontre entre le sang et des cellules qui présentent le FT permet la fixation et l'activation du FVII, et la synthèse de traces de thrombine *via* la génération de faibles quantités de FXa. Ces traces de thrombine permettront d'une part de recruter les plaquettes en les activant par leurs récepteurs membranaires PARs, de générer des traces de fibrine, et d'autre part d'activer les facteurs V, VIII, XIII et XI. Cette rétroactivation par la thrombine permet alors d'amplifier considérablement les quantités de FIXa, FXa et thrombine générée. Cette génération explosive de thrombine permet alors d'activer de grande quantité de fibrinogène en fibrine. Ces monomères solubles de fibrine seront ensuite transformés en fibrine stable par action du FXIIIa. Les phospholipides membranaires et le Ca²⁺ sont essentiels à l'activation de la coagulation à la surface cellulaire. L'activation de ces sérine-protéases peut alors s'autoentretenir mais est étroitement régulée par les inhibiteurs physiologiques (AT, système PC-PS) qui évitent ainsi sa propagation à l'ensemble de l'arbre vasculaire.

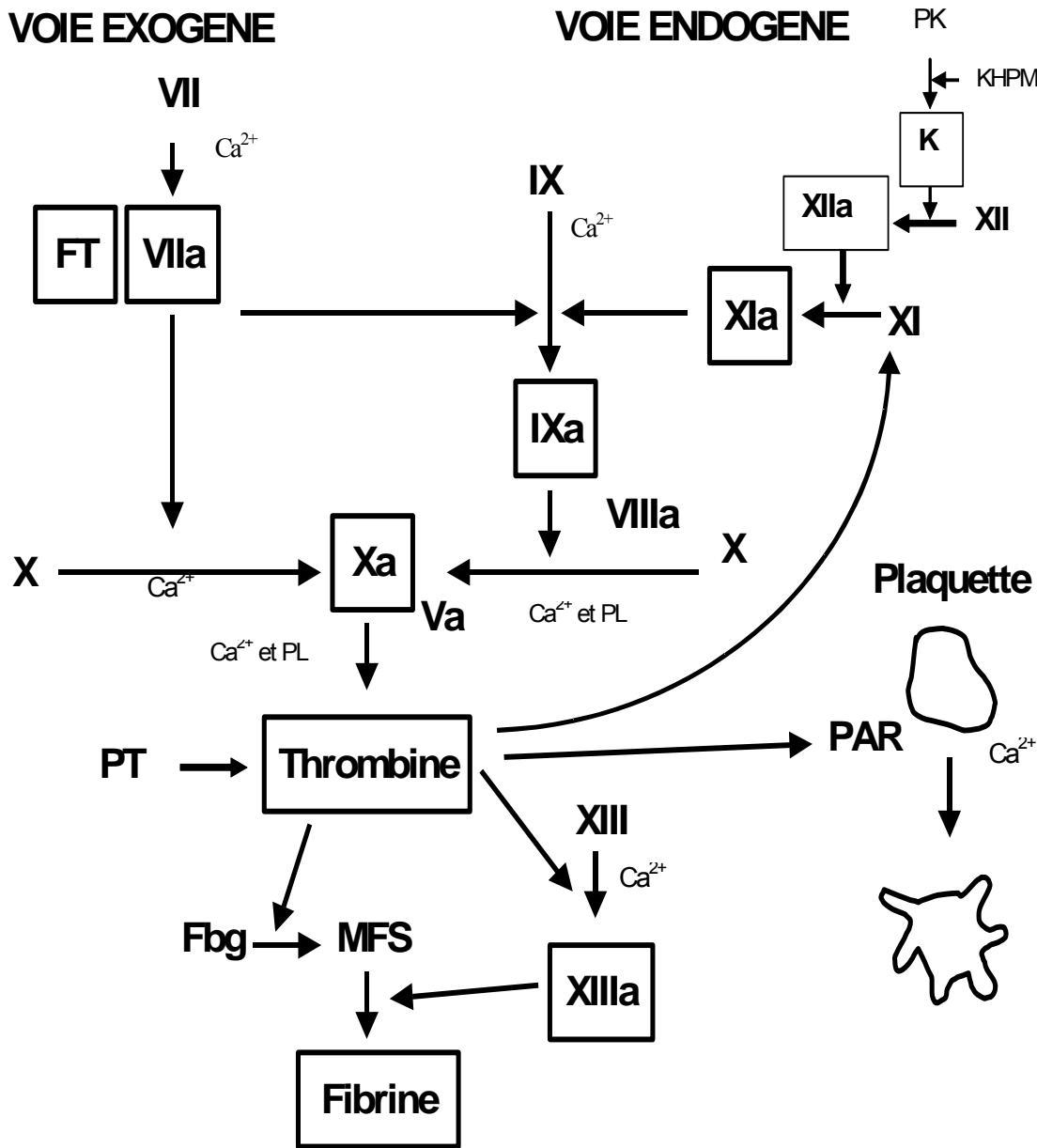


Figure 11 : La cascade de coagulation. La réaction est initiée par de faibles quantités de FT qui vont permettre la génération de traces de facteurs VIIa, Xa et de thrombine. Ces petites quantités de thrombine permettent d'activer les plaquettes *via* leurs récepteurs PARs mais aussi les facteurs V, VIII, XI, XIII et le fibrinogène. L'activation de la voie endogène *via* les FXIa et FIXa permet d'amplifier considérablement la génération de thrombine et de fibrine. Cette cascade de la coagulation est régulée par l'antithrombine (AT) qui inhibe principalement le FXa et la thrombine ; par les protéine C et protéine S qui inhibent les FVa et FVIIIa et par le TFPI qui inhibe le FT. Ca^{2+} : calcium ionisé, PT : prothrombine, Fbg : fibrinogène, MSF : Monomères solubles de fibrine, PAR : Protease activated Receptor. D'après Mackman [233].

VI. 1. 3. Expression tissulaire et cellulaire du FT

L'expression du FT est variable selon les tissus ou organes et résulte probablement d'une régulation transcriptionnelle différente selon les types cellulaires. Cette régulation très fine de l'expression du FT, encore largement méconnue, est probablement la conséquence d'une coopération entre plusieurs facteurs de transcription spécifiques du type cellulaire incriminé. Le FT est retrouvé en grande quantité dans des organes richement vascularisés tels que le poumon, le cerveau, le placenta et dans la capsule de différents organes comme le foie, le rein et la rate; son expression y est constitutive [234]. Les muscles squelettiques et les articulations en contiennent très peu. Le FT peut être assimilé à une « enveloppe hémostatique » qui protège chacun de ces organes d'une brèche vasculaire accidentelle. Certaines tumeurs en contiennent aussi beaucoup (épithéliomas, adénocarcinomes et promyélocytes de la LAM3) [235, 236].

Dans les vaisseaux sanguins, le FT est retrouvé au niveau de l'adventice des artères saines. Il est indétectable dans l'endothélium et l'intima et n'est présent qu'à de très faibles quantités dans la média d'artères musculaires comme les coronaires ou les artères mammaires internes [237, 238].

Les cellules en contact direct avec les facteurs de coagulation n'expriment pas le FT (lignées érythroblastiques, mégacaryocytaires et lymphoblastiques). La synthèse de FT par les granulocytes fait encore l'objet de controverses [239-241].

Osterud affirme que le neutrophile ne fait qu'absorber les microparticules circulantes d'origine monocyttaire pour s'enrichir alors en FT [242]. Actuellement, l'expression éventuelle du FT par la plaquette est aussi sujette à débat [243-246].

L'expression du FT est constitutive dans les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules de Schwann du nerf, les cellules glomérulaires rénales, les cellules stromales de l'endomètre, les cellules épithéliales cutanées, les cardiomyocytes, l'hépatocyte, les fibroblastes de l'adventice des vaisseaux et les adipocytes [234]. Le FT n'est synthétisé qu'en très faibles quantités dans les cellules musculaires lisses (CML) de média d'artères saines.

L'expression du FT est inductible dans les monocytes sanguins, les macrophages tissulaires, les cellules endothéliales et les CML en réponse à des *stimuli* variés.

Il est maintenant bien établi que l'activité procoagulante des leucocytes est liée à celles des monocytes. Au repos, le monocyte ne synthétise pas de FT mais répond à de nombreux agents stimulants (les complexes immuns, les fragments activés du complément, des cytokines proinflammatoires comme l'IL-1 β ou le TNF α induisent l'expression monocyttaire du FT) [247-249]. L'INF γ peut induire une activité FT macrophagique mais ne serait qu'un costimulateur pour le monocyte [250, 251]. L'endotoxine bactérienne ou lipopolysaccharide des bacilles Gram négatif est le plus puissant inducteur direct de l'activité FT [252, 253]. De

nombreux métabolites lipidiques sont aussi capables d'induire la synthèse du FT. Le cholestérol libre ou estérifié, les VLDL ou les LDL peuvent induire une activité procoagulante monocytaire in vitro [254]. L'hypoxie ou l'acidose peuvent induire l'expression du FT dans les cellules mononucléées de tissus pulmonaires murins [255].

La cellule endothéliale tapisse sous forme d'une monocouche cellulaire l'ensemble de l'arbre vasculaire et est en interface direct avec le flux sanguin. Elle est physiologiquement non thrombogène car présente sur sa surface apicale des glycoaminoglycanes (GAG) ou la thrombomoduline. Elle présente aussi une activité profibrinolytique en étant capable de relarguer de grandes quantités de tissu Plasminogen Activator (t-PA). Au repos, la cellule endothéliale ne synthétise pas de FT. Cependant, l'endotoxine, le $TNF\alpha$ ou l'IL-1 β induisent sa synthèse tout en diminuant l'activité de la thrombomoduline [256, 257]. La thrombine peut activer la cellule endothéliale en se liant à ses récepteurs PARs membranaires [258].

D'autres molécules comme l'hémoglobine libre ou la fibrine seraient capables d'amplifier l'expression du FT par la cellule endothéliale préalablement stimulée par l'endotoxine et pourraient ainsi avoir un effet d'amplification de la coagulation dans certaines pathologies comme le sepsis ou l'athérosclérose [259, 260]. La cellule endothéliale en apoptose ne modifie pas sa synthèse de FT [261, 262], mais l'apoptose favorise le démasquage du FT encrypté dans des petites microinvaginations membranaires (cavéoles) et sa dissémination sanguine par libération de microvésicules membranaires.

Enfin la possibilité d'expression du FT par les cellules musculaires lisses est démontrée mais sa régulation reste mal connue.

Le FT membranaire n'est pas directement accessible aux FVII et FVIIa, mais se situe, pour les CML, au sein des cavéoles qui forment ainsi un compartiment de réserve du FT [263, 264]. Des modifications membranaires majeures comme la lyse cellulaire ou l'exposition à un stress oxydant permettent de dévoiler ce FT qui peut ainsi se lier au FVII et FVIIa. *A contrario*, il semblerait que le FT soit directement accessible sur la membrane monocytaire [265].

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un processus hautement régulé qui aboutit à la condensation de la chromatine, à la margination du cytosol et au bourgonnement de la membrane cytoplasmique. L'apoptose permet de dévoiler le FT qui était encrypté au niveau des cavéoles et qui se retrouve alors exposé à la surface cellulaire dans un environnement riche en phosphatidylsérine, permettant d'augmenter considérablement son activité sans augmentation des taux de la protéine. L'apoptose est un événement important du développement de la plaque athéroscléreuse. Elle touche tous les types cellulaires mais préférentiellement la CML, la cellule endothéliale et surtout le macrophage.

VI. 1. 4. FT plasmatique

La disponibilité de trousse commerciales de type ELISA a rendu aisé le dosage de l'antigène FT dans le plasma. Les individus sains ont des taux plasmatiques bas de FT [266, 267]. Les valeurs moyennes normales sont comprises entre 108 et 172 pg/ml [266-271]. Les taux plasmatiques de l'antigène FT sont plus élevés chez les patients présentant un angor instable ou un infarctus du myocarde à la phase aiguë [272-276].

Dans l'angor d'effort, certaines études ne trouvent pas de différence par rapport aux contrôles alors que d'autres études retrouvent des taux augmentés [272, 275, 276]. Dans l'étude de Falciani et coll., les taux plasmatiques de FT sont retrouvés corrélés aux F1+2 de la prothrombine (reflet de l'activation de la coagulation), aux complexes TAT ainsi qu'au TFPI [272].

Le mode de préparation des plasmas utilisés pour ces dosages (centrifugation à environ 2000g pendant 20 min) suggère que le FT mesuré correspond pour une part à du FT soluble mais aussi à du FT véhiculé par les microparticules circulantes.

Le FT soluble augmente dans le cancer, le sepsis et les syndromes coronariens mais n'est probablement pas capable d'initier la cascade de la coagulation car non enchassé dans la membrane phospholipidique nécessaire à son activité procoagulante [277]. De même, le rôle physiopathologique de la forme soluble altTF décrite par Bogdanov et coll. reste à ce jour inconnu. Malgré un fort pouvoir procoagulant, sa concentration sanguine serait physiologiquement très faible [226]. Les concentrations plasmatiques de FT augmentent aussi dans la coagulation intravasculaire disséminée [267, 271], dans le syndrome des anti-phospholipides [278], dans la cirrhose [279], dans l'insuffisance rénale chronique [268], chez les patients avec complications microvasculaires du diabète [280], dans les vascularites [270]. Une réaction immunologique importante ou une destruction tissulaire augmente donc le taux de FT dans la circulation générale.

Les microparticules sont d'origine endothéliale, plaquettaire ou leucocytaire et peuvent fusionner entre elles pour former des particules hybrides riches en FT. La P-sélectine de la membrane plaquettaire ou endothéliale ou même des molécules de P-sélectine soluble peuvent se lier à la P-selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) de la membranaire monocytaire pour créer ces microparticules hybrides cellule endothéliale-monocyte ou plaquette-monocyte. Le bourgeonnement de ces microparticules à partir de la membrane monocytaire, endothéliale ou plaquettaire est fortement stimulé par cette interaction P-sélectine et PSGL-1 [281]. La libération de microparticules par le monocyte est aussi augmentée par l'apoptose et la stimulation par l'endotoxine ou les cytokines proinflammatoires. Les concentrations de microparticules sont élevées dans le sepsis, le lupus et les syndromes coronariens. Les patients en angor instable ou avec un infarctus du

myocarde présentent des taux de microparticules circulantes plus élevés que ceux en angor stable ou non coronariens [282]. Des résultats similaires ont été retrouvés en pathologie ischémique cérébrale [283, 284]. Ces microparticules seraient un reflet fiable de la présence d'une complication thrombogène et pourraient constituer un marqueur pronostique des récives ischémiques. Elles contiennent beaucoup de FT et pourraient être un vecteur de dissémination du pouvoir thrombogène à distance du foyer d'origine.

Polgar et coll. suggèrent que le FT circulant véhiculé par ces microparticules est surtout mis à contribution dans la croissance du thrombus sur lésion vasculaire minime, pouvant à l'extrême se réduire uniquement à la cellule endothéliale activée. *A contrario*, le FT stocké au sein de la paroi vasculaire, par exemple dans le noyau athéromateux, permettrait la formation et la croissance d'un thrombus plus massif comme ceux rencontrés à la surface de la plaque d'athérosclérose rompue [281].

VI. 1. 5. Régulation de l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa par les inhibiteurs physiologiques

L'activation de la coagulation par la voie du FT-FVIIa est régulé par 2 systèmes inhibiteurs agissant sur l'activité du complexe FT-FVIIa : l'antithrombine (AT) et le TFPI.

L'AT est le principal inhibiteur des sérines-protéases de la coagulation (Serpine). Cette glycoprotéine de synthèse hépatique, inhibe le FT par 2 mécanismes indirects. D'une part, la formation du complexe AT-FT-FVIIa rend le FVIIa incapable de lier un nouveau site du FT et d'autre part, la liaison de l'AT au FVIIa entraîne des modifications conformationnelles du FVIIa qui accélèrent alors la dissociation des complexes FT-FVIIa [285]. Une étude récente a montré que l'AT s'opposait au développement de MH d'origine colorectale chez la souris [286].

Le TFPI est l'inhibiteur spécifique du FT [287, 288]. Il inhibe non seulement l'activité du complexe FT-FVIIa, mais aussi celle du FXa. Cette inhibition se déroule en 2 étapes : Dans un premier temps, le TFPI se lie par son domaine K2 au FXa qu'il inhibe en formant un complexe TFPI-FXa. Dans un second temps, le complexe TFPI-FXa se lie par le domaine K1 au complexe FT-FVIIa formant un complexe quadri-moléculaire FT-FVIIa-TFPI-FXa inactif [289]. Ce mécanisme d'action n'est possible qu'à partir du moment où un peu de FXa a été généré. L'inhibition directe du complexe FT-FVIIa -FXa par le TFPI est accessoire. Des études récentes ont montré que le TFPI s'opposait à la croissance et à l'invasion tumorale [290]. Une deuxième forme de TFPI a été mise en évidence récemment (TFPI-2 ou placental

protein 5 [PP5] ou matrix-associated serine protease inhibitor [MSPI]) avec, là encore, une probable action anti-tumorale [291].

VI. 1. 6. Rôle du FT dans l'embryogénèse, la migration cellulaire et l'angiogénèse

L'expression du FT est importante dans les cellules non vasculaires de l'organisme. Cette réserve de FT d'expression constitutive pourrait jouer un rôle autre que celui lié à l'activation de la coagulation. Plusieurs arguments suggèrent le rôle du FT dans la migration cellulaire et l'angiogénèse avec ainsi son implication dans l'embryogénèse, le remodelage vasculaire et le développement tumoral [292].

VI. 1. 6. 1. Rôle du FT dans l'embryogénèse

Il n'existe pas de déficit viable en FT. En 1996, 3 groupes indépendants ont créé une souris délétée du gène FT [293-295]. Les embryons mFT^{-/-} meurent *in utero* à 10,5 jour de développement par hémorragie et désorganisation importante de la vascularisation du sac vitellin. Il s'agit d'un défaut du développement de la couche musculaire entourant les tubes de cellules endothéliales du vaisseau primitif. L'absence de FT semble affecter la structure des vaisseaux plutôt que la régulation de la différenciation des cellules endothéliales [129]. Les mécanismes par lesquels le système FT-FVII modifie l'angiogénèse semblent dépendants de la signalisation intracellulaire du FT [216, 296].

Les embryons mFT^{-/-}, hTF⁺ chez qui une petite activité FT est restaurée par un minigène contenant le promoteur et l'ADNc humains (permettant ainsi de retrouver 1% d'activité FT) survivent sans hémorragie du sac vitellin [297]. Par contre, le minigène humain délété du domaine extracellulaire, ne permet pas la survie de ces embryons [298]. Ces travaux mettent en évidence le rôle clé du FT dans l'embryogénèse et le développement vasculaire.

La partie extracellulaire du FT (qui joue le rôle de récepteur du FVII) est absolument nécessaire à l'embryogénèse, comme l'ont montré différents modèles de souris génétiquement modifiées pour les parties extra ou intracellulaires du FT [298].

VI. 1. 6. 2. Rôle du FT dans l'angiogénèse

L'hémostase et l'angiogénèse sont étroitement liées par l'intermédiaire de la fibrine qui joue un rôle dans la migration cellulaire et la libération de facteurs pro et anti-angiogéniques [129]. Le FT participe à l'angiogénèse par l'intermédiaire de sa voie protéolytique (thrombine) ou directement par le complexe FT-FVIIa. Ces effets sont médiés par le clivage et l'activation de protéines G couplées avec les récepteurs PARs (Protease-Activated Receptors). Il existe d'étroites interactions entre le système FT-FVII et les facteurs angiogéniques : *in vitro*, le VEGF induit une augmentation de l'expression du FT dans des cellules endothéliales en culture [299]; de manière réciproque, l'apport de FVIIa sur des fibroblastes en culture, activant la formation de complexes FT-FVIIa, augmente l'expression du VEGF et favorise l'angiogénèse [300]. De la même façon, le FT peut stimuler l'expression de VEGF par les cellules endothéliales humaines [301]. *In vivo*, notre équipe a récemment démontré que l'administration de bFGF par voie systémique augmente l'expression du FT sur les monocytes circulants et dans la paroi vasculaire [302].

Le FT possède une structure de récepteur aux cytokines de classe II et présente une sérine phosphorylable dans son domaine intracytoplasmique [303]. La majeure partie des complexes FT-FVIIa se situe à la face basolatérale des cellules exprimant le FT de manière constitutive qui sont inactifs pour la coagulation mais suggère leurs implications dans la transduction de signaux intracellulaires [304]. Le seul ligand physiologique connu du FT est le FVIIa. Sa fixation au FT permet d'induire des variations du calcium intracytosolique dans différents types cellulaires comme dans la cellule endothéliale, moduler l'expression de différents transcrits dans les fibroblastes humains par amplification de la poly(A) polymérase et induire la synthèse de VEGF pouvant en retour induire la synthèse de FT [300, 305-307]. Les mécanismes transductionnels font intervenir la phosphorylation de différentes protéines kinase comme la PKC, les MAP-kinases ou la FAK [305, 308, 309]. Il a récemment été suggéré que les effets cellulaires du FT pouvaient être indirects et dûs à l'activation des PARs (Protease Activated Receptors). Les PARs sont des récepteurs cellulaires composés de 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G et sont activés de manière irréversible par clivage de leur extrémité N-terminale par des sérine-protéases. Quatre PARs ont été identifiés à ce jour dont 3 (PAR-1, PAR-3 et PAR-4) sont des récepteurs de la thrombine [258, 310]. Le complexe FT-FVIIa active PAR-2, FXa active PAR-1 et -2 et la thrombine active PAR-1, -3 et -4 [233]. Les PARs -1, -2 et -4 sont exprimés par de nombreuses cellules vasculaires comme la cellule endothéliale et la CML [258]. Les PAR-1 et -4 sont exprimés par les plaquettes [311, 312]. Le rôle d'activation cellulaire du FT est complexe et n'est donc pas médié uniquement par son domaine intracellulaire mais aussi

par son domaine extracellulaire avec son rôle activateur des PARs *via* les FVIIa, FXa et thrombine dont il a permis la génération.

Le rôle du FT dans l'angiogénèse tumorale a progressivement été démontré. Cet aspect est développé plus loin (Chapitre VII).

VI. 1. 6. 3. Effet anti-apoptotique de la liaison FT-FVIIa

De récents travaux ont montré un effet anti-apoptotique du couple FT-FVIIa sur des cellules BHK (*Baby Hamster Kidney*) [313]. Cet effet anti-apoptotique a été spécifique du FVIIa puisqu'une inhibition spécifique des FXa et FIIa a été sans effet et n'a pas empêché la protection cellulaire. L'effet anti-apoptotique a été dépendant de la liaison du FVII au FT et de l'activité protéolytique du FVIIa. Ces résultats ont été ensuite confirmés par une étude sur des cellules de carcinomes mammaires [314].

VII. Rôle du FT dans la croissance tumorale, l'angiogénèse tumorale et le potentiel métastatique

Des modèles d'angiogénèse tumorale chez la souris ont montré le rôle du système FT-FVII dans la majoration du potentiel métastatique des tumeurs [216] et de leur vascularisation [296, 315]. Ces résultats ont été obtenus dans des modèles de cancer de l'ovaire et de mélanome. L'implication du FT dans l'amplification du processus angiogénique tumoral semble donc être aujourd'hui admise.

L'inhibition du FT dans un modèle de sarcome de l'ovaire murin inhibe la croissance et la vascularisation tumorale. Le FT favorise l'angiogénèse tumorale par l'induction de facteurs angiogéniques tel que le VEGF et l'inhibition de facteurs antiangiogéniques tels que la thrombospondine [296]. Le FT permet aussi, par son domaine intracytoplasmique, la prolifération et la dissémination métastatique de cellules de mélanome humain [216].

La dissémination des cellules tumorales nécessite la fixation du FVIIa au FT. Belting et coll. ont récemment démontré, par l'étude de souris présentant un FT dépourvu du domaine intracellulaire, que ce domaine inhibe l'angiogénèse et la tumorigénèse induite par PAR-2. La phosphorylation du domaine intracytoplasmique lève cette inhibition [218].

VII. 1. Tumeurs et cellules tumorales exprimant le FT

L'immunohistochimie a montré que le FT est exprimé dans de nombreuses tumeurs, directement par les cellules tumorales ou par les cellules du stroma tumoral.

Ont été répertoriés : les gliomes [316-318], le cancer du sein [319-324], le cancer pulmonaire [325-328], le cancer prostatique [329-331], le cancer du pancréas [332, 333], le cancer de l'ovaire [334], l'hépatocarcinome [335], et également le CCR [336-339].

Il a de plus été démontré pour certains cancers (cancer du sein, mélanome, et aussi CCR) que cette expression du FT était corrélée à un potentiel invasif et métastatique accru [216, 320, 325, 329, 337]. Ceci peut passer par une activation de la coagulation ou par une activation de l'angiogénèse. En effet le FT joue également un rôle pro-angiogénique et son degré d'expression est également corrélé à l'importance de l'angiogénèse tumorale [340, 341].

Cette activation de la coagulation par hyperexpression du FT peut être locale et conduire au « piégeage » de cellules tumorales dans un caillot de fibrine. Celui-ci se bloque dans la micro-circulation et participe ainsi à la dissémination et la greffe métastatique [342].

Les cellules tumorales expriment parfois le FT de la même façon que les cellules non tumorales de même origine. Mais le plus souvent, la transformation néoplasique conduit à une altération de l'antigène du FT avec soit expression du FT par le tissu tumoral alors que le tissu non tumoral de même origine n'exprime pas le FT, soit absence d'expression du FT par la tumeur alors que le tissu normal l'exprime [221]. L'expression du FT était localisée sur les cellules tumorales ou les cellules du stroma tumoral.

Les cellules épithéliales non tumorales expriment souvent un taux basal de FT. Après transformation néoplasique, ces cellules tumorales épithéliales expriment souvent plus de FT que les cellules tumorales non épithéliales [343].

L'expression du FT est variable parmi les tumeurs de même type histologique ainsi qu'à l'intérieur même d'une tumeur où le marquage en immunohistochimie peut être hétérogène [343]. Les cellules de cancers bronchiques dérivant des cellules épithéliales bronchiques FT positives, expriment le FT dans la plupart des études [325-328]. Par contre, dans les études sur les carcinomes mammaires, les cellules stromales (myofibroblastes, macrophages, parfois cellules endothéliales) exprimaient plus le FT que les cellules tumorales [319-324], alors que les cellules stromales mammaires non tumorales exprimaient rarement le FT [343]. En plus d'une expression constitutive, une surexpression du gène du FT peut être induite dans les tissus normaux et tumoraux par l'inflammation ou des signaux tumoraux spécifiques. L'expression du FT par les cellules stromales et les cellules tumorales à la limite hôte - tumeur, pourrait favoriser la croissance tumorale et le potentiel métastatique [323,

324, 344]. Dans les cancers pancréatiques, l'expression de FT se fait de façon préférentielle au front d'invasion tumoral (desmoplasie) [333].

On observe une élévation de la concentration plasmatique de FT chez les patientes porteuses d'un cancer du sein traité par chimio ou hormonothérapie par rapport à une population contrôle saine [323]. Les cellules tumorales et les cellules stromales expriment alors de la même façon le FT [323]. La concentration plasmatique de FT augmente chez les patients porteurs de mélanome mais sans corrélation avec l'évolution de la maladie et/ou le potentiel métastatique [345].

VII. 2. FT et cancers colorectaux

Des données concordantes indiquent que la voie du FT joue aussi un rôle important dans le potentiel invasif et métastatique des CCR.

D'une part, différentes lignées humaines de cancer colique expriment du FT. D'autre part, il existe une relation entre l'importance de l'expression du FT monocytaire et le potentiel évolutif des CCR humains. Ces résultats sont concordants avec les études menées dans l'angiogénèse tumorale dans lesquelles la vascularisation des tumeurs est fortement corrélée à l'expression et à l'activité du FT [336]. Il a été montré que 57 % des tumeurs colorectales exprimaient le FT. L'expression du FT dans l'adénocarcinome colique serait un facteur de risque d'apparition des MH et ainsi un facteur pronostic du CCR. L'expression du FT a été corrélée au stade TNM et à la survie [337]. Fait important, l'expression de FT par la tumeur primitive colique est plus intense chez les patients porteurs de MH. De plus, chez un même patient, l'expression de FT est plus importante dans les MH que dans la tumeur primitive. La survie à 3 ans a été retrouvée significativement diminuée chez les patients porteurs de tumeurs coliques exprimant le FT (39 % versus 88 %, $p < 0,005$) [337, 338, 346]. Ainsi, l'implication du FT dans l'amplification du processus angiogénique tumoral semble être aujourd'hui admise.

Le FT se situe à l'interface entre coagulation et croissance tumorale. On connaît l'étroite relation entre le VEGF et le FT, en particulier au cours des stades précoces de la transformation adénome - CCR [347]. Cependant, il n'a pas été montré de relation entre l'expression du VEGF ou du FT et la microdensité vasculaire tumorale, le stade TNM ou la survie [347]. L'hyperexpression de VEGF par la cellule tumorale stimule l'angiogénèse, l'expression de FT et augmente la perméabilité vasculaire. Des études déjà anciennes ont montré que l'expression du VEGF était corrélée à la progression tumorale chez les patients porteurs d'un CCR [348]. Mais le fait que l'activation de la coagulation dans le CCR soit liée à une surexpression du FT est une notion récente [349].

VII. 3. Modifications génétiques tumorales et FT

Les liens entre anomalies de la coagulation et développement tumoral sont, en partie expliqués par l'étroite relation entre FT et oncogènes. Il a été montré que l'activation de l'oncogène K-ras et de p53 augmentait l'expression du FT ainsi que l'activité procoagulante des CCR [350]. L'activation de l'oncogène *MET* dans un modèle de souris a conduit à la formation d'hépatocarcinomes multi-focaux. Ceci a été précédé par un syndrome thrombo-hémorragique fatal renforçant l'idée d'un lien étroit entre activation oncogénique et hémostase. Certaines anomalies de la coagulation ont été corrigées par un inhibiteur de la cyclo-oxygénase 2 (Rofecoxib) [351].

La progression tumorale semble ainsi guidée par les oncogènes *via* des anomalies de la coagulation. Des études récentes ont confirmé l'action anti-tumorale des héparines de bas poids moléculaire [352]. De la même façon, de nombreuses protéines de la coagulation ont joué un rôle important dans la croissance tumorale, le processus métastatique et l'angiogénèse tumorale [212].

VIII. Possibilités de modulation pharmacologique du FT

VIII. 1. Modulation de l'expression

Les agents pharmacologiques et molécules thérapeutiques influençant l'expression du FT, sont nombreux bien qu'aucun d'entre eux ne soit vraiment spécifique, ni utilisé en pratique clinique pour cet usage précis. L'objet de ce paragraphe n'est pas d'en établir une liste exhaustive.

*Les corticoïdes ont un effet discordant sur l'expression du FT dans les cellules mononucléées: l'effet est activateur ou répresseur selon que les cellules sont co-incubées ou non avec des lymphocytes [353, 354].

*Les oestro-progestatifs augmentent l'expression du FT probablement par une activation de $\text{NK-}\kappa\text{B}$ [355].

*L'effet de la ciclosporine est biphasique : l'expression du FT est inhibée à faible dose mais augmentée à dose plus forte [356].

*Les analogues nucléotidiques comme la pentoxyphilline augmentent le contenu cellulaire en AMPc et diminuent la transcription du FT [357].

*L'acide tout-trans-rétinoïque inhibe l'expression du FT monocyttaire [358]. La desmopressine augmente l'expression de FT par les cellules endothéliales *in vitro* et favorise l'activation

plaquettaire [359].

*L'aspirine à forte dose inhibe *in vitro* la transcription du FT dans le monocyte stimulé en bloquant la translocation de NF- κ B/c-Rel dans le noyau [360].

*Des agents antioxydants comme le curcumin ou le glutathion inhibent l'expression du FT par des effets transcriptionnels et post-transcriptionnels [361]. Une étude récente a testé l'effet anti-tumoral de l'EF 24 un des composants principaux du curcumin sur des cellules humaines de carcinomes mammaires et de mélanomes [362]. Cet effet est dépendant de la liaison FVIIa et FT. L'EF 24 possède des propriétés anti-tumorales sur des cellules humaines de cancer de l'ovaire résistantes à l'oxaliplatine [363].

*En bloquant la synthèse de l'angiotensine II et augmentant la synthèse de NO, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion s'opposent à l'activation de NK- κ B et réduisent ainsi la synthèse de FT [364].

*La L-arginine, principal précurseur du NO, atténue l'expression du FT monocyttaire dans un modèle d'angioplastie sur lapin hypercholestérolémique [365].

*Les fibrates ont des propriétés normolipémiantes mais également antiathérogènes. Leurs effets pharmacologiques sont médiés par les Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α dont ils sont des agonistes. Neve et coll. démontrent que l'acide fénofibrique et d'autres agonistes PPAR α inhibent la synthèse du transcrit FT dans la lignée monocyttaire THP-1 mais également l'activité FT de monocytes et macrophages sanguins stimulés par l'IL-1 β ou le LPS [366, 367].

*De nouvelles stratégies utilisant des ribozymes, des oligodésoxynucléotides antisens ou la technologie de RNA interference ont permis d'inhiber de manière efficace la traduction protéique [261]. Cependant le développement clinique de ces molécules se heurte aux problèmes de leur vectorisation et de la sécurisation de leur administration mais aussi aux importantes quantités à utiliser pour assurer leur efficacité.

*Les statines sont des inhibiteurs de la 3-hydroxy-3-methylglutarylcoenzyme A (HMG-CoA) Reductase et sont très utilisées pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes permettant de réduire le LDL-cholestérol. De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* démontrent que les statines inhibent l'expression et l'activité du FT. La simvastatine, fluvastatine, cerivastatine et pravastatine réduisent *in vitro* l'expression de l'activité et de l'antigène FT par des monocytes et macrophages stimulés ou non par le LPS ou les LDL acétylées [368-370].

La simvastatine réduit également l'expression du FT dans la CML et la cellule endothéliale [371, 372]. Quatre études chez l'animal et 3 chez l'homme ont démontré l'effet *in vivo* des statines sur le FT.

Il faut signaler que le risque de CCR a été diminué chez les utilisateurs réguliers (pendant au moins 5 ans) de statines [373].

VIII. 2. Inhibition directe de l'activité du FT

De nombreuses molécules ont initialement été développées pour inhiber l'activité du FT puis d'autres ont été créées pour inhiber plus globalement l'activité du complexe FT-FVIIa.

Plusieurs études chez l'animal et chez l'homme ont démontré les propriétés antithrombotiques d'anticorps monoclonaux anti-FT comme le D3H44 ou l'AP-1 qui inhibent la formation ou l'activité du complexe FT-FVIIa [374].

L'inhibition du complexe FT-FVIIa a aussi pu être médiée par des mutants FT solubles, comme le hTFAA composé uniquement de la partie extracellulaire de la molécule, et qui se lie au FVII sans l'activer [375].

Des peptides ou petites molécules synthétiques comme le PHA-927F, sont capables d'inhiber la liaison du FX au tandem FT-FVIIa sans perturber l'activation du FIX ; ce qui se traduit par une bonne efficacité antithrombotique sans augmentation du risque hémorragique associé [376].

Une autre approche envisagée a été d'inhiber les fonctions du FVIIa ou la formation du complexe FT-FVIIa. Le FFR-FVIIa ou ASIS (Active Site-Inactivated factor Seven) est une molécule de FVIIa dont le site actif est inactivé de manière irréversible par le D-Phe-L-Phe-L-Arg chloro-methyl ketone [377, 378]. L'ASIS entre en compétition avec le FVIIa pour se lier au FT et inhibe ainsi l'activation du FX. L'ASIS administré en intraveineux ou directement dans la carotide a démontré son activité antithrombotique chez l'animal. De nouveaux peptides inhibiteurs de l'exosite du FVIIa comme l'E-76 ou A-183 neutralisent l'activation du FX et sont en cours de développement [379]. De petits peptides inhibiteurs du complexe FT-FVIIa comme XK1 ou rNAPc2 ont démontré leurs efficacité dans des modèles animaux de thrombose artérielle et de choc septique [380].

Le TFPI recombinant (TFPIr), appelé tifacogin, inhibe la thrombogénèse dans de nombreux modèles animaux [381, 382]. Mais à cause des grandes quantités de TFPIr qui devaient être utilisées pour étudier ses effets en thromboses artérielles ou veineuses, il a surtout été testé dans le choc septique. L'efficacité clinique du TFPIr n'y a pas été complètement démontrée et son utilisation semblait même associée à un risque accru de saignement. L'utilisation de rétrovirus ou d'adénovirus contenant le gène du TFPI a permis d'augmenter les concentrations de la protéine dans la paroi vasculaire et d'inhiber efficacement la formation du thrombus et la resténose [383, 384].

Au total, le pronostic du CCR est dominé par l'apparition et le développement de métastases hépatiques. A l'heure actuelle, les chimiothérapies adjuvantes sont insuffisantes pour empêcher ce développement dans environ 20 à 30 % des cas.

Par ailleurs, des données concordantes indiquent que la voie du FT joue aussi un rôle important dans le potentiel invasif et métastatique des CCR :

1. Différentes lignées humaines de CCR expriment du FT,
2. Il existe une relation entre l'importance de l'expression du FT monocytaire et le potentiel évolutif des cancers colorectaux humains.
3. L'expression du FT dans les CCR serait un facteur de risque d'apparition des MH

et ainsi un facteur pronostic du CCR.

Ces résultats sont concordants avec les études menées dans l'angiogénèse tumorale dans lesquelles la vascularisation des tumeurs est fortement corrélée à l'expression et à l'activité du FT. A ce jour aucun travail n'a spécifiquement étudié l'effet d'une inhibition spécifique de la voie du FT en pathologie cancéreuse colorectale.

Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une inhibition de la voie du FT pourrait empêcher le développement de MH.

Notre équipe avait récemment testé un inhibiteur de l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa, le FFR-VIIa, qui est une molécule variante du FVIIa humain, mais dont le site actif est bloqué par un tripeptide. Nous avons constaté que le FFR-VIIa était capable d'inhiber l'angiogénèse dans un modèle original développé dans l'oreille de souris [385].

Nous nous sommes donc fixé l'objectif d'explorer l'effet de cet inhibiteur sur l'évolution du CCR dans un modèle expérimental adapté.

Travaux personnels

Les améliorations pronostiques du CCR viendront d'un diagnostic plus précoce permettant la résection dans de bonnes conditions de la tumeur primitive, mais surtout du contrôle de la dissémination des métastases, au premier rang desquelles les MH, qui représentent aujourd'hui la première cause de mortalité de ces patients. Soixante à 75 % des patients porteurs de MH inopérables sont résistants au 5-FU. Les chimiothérapies dites de 2ème et 3ème lignes sont alors le seul recours avec des résultats médiocres [93, 96, 386]. Devant l'efficacité très partielle des traitements classiques, il semble urgent de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à s'opposer au processus tumoral métastatique.

L'immunothérapie, les anticorps monoclonaux, la thérapie génique, sont autant de voies de recherche intéressantes. A ce titre, les stratégies anti-angiogéniques constituent une arme anti-tumorale supplémentaire. La compréhension de l'angiogénèse tumorale a permis l'emploi de nouvelles molécules comme les molécules anti-EGFR et anti-VEGF (Erbix[®], Avastin[®]) avec des résultats encourageants [387, 388]. Le FT, récepteur cellulaire du facteur VII de la coagulation possède un rôle majeur dans l'angiogénèse et le potentiel invasif des CCR. Cependant, les mécanismes d'action sous jacents sont complexes et encore incomplètement connus. Lors d'une effraction vasculaire, les cellules exprimant le FT rencontrent le FVII et le couple FT-FVIIa conduit par son action protéolytique, à la formation de fibrine par le biais du facteur Xa et de la thrombine (facteur IIa). Il est probable que la dissémination tumorale soit sous la dépendance de la voie de formation de fibrine [389], mais aussi des différentes voies de signalisation directement induites par le FT [216, 390]. Différentes études ont montré que l'inhibition de l'activité protéolytique du couple TF-FVIIa pouvait s'opposer à la croissance tumorale et aux métastases pulmonaires [296, 341, 390-392]. Mais aucun travail n'a montré qu'une telle inhibition pouvait s'opposer, in vivo, à la greffe de cellules tumorales dans le foie. Nous rapportons les résultats de nos travaux sur l'inhibition de la voie du FT par un inhibiteur compétitif du facteur VIIa (FFR-VIIa) dans un modèle expérimental de tumeur sous cutanées et de MH induites chez le rat.

1. Les modèles expérimentaux de métastases hépatiques

La mise au point de traitements des MH de CCR nécessite l'utilisation de modèles expérimentaux. Différents modèles sont décrits dans la littérature [393] :

1. Un modèle de cancer colique chimio-induit (par la 1, 2 diméthylhydralazine ou ses dérivés comme l'azoxyméthane) entraînant 6 mois après l'injection 20 à 25 % de MH. Ce modèle respecte bien l'histoire naturelle du cancer mais reste peu utilisable en raison de son faible rendement et de son inertie.
2. L'injection intra-splénique de cellules coliques tumorales humaines permet d'obtenir des MH chez la souris athymique.
3. L'injection orthotopique de cellules tumorales coliques dans la paroi du caecum permettrait de reproduire l'histoire naturelle des cancers coliques humains et de leurs MH associées. Il reste cependant à établir que ces injections ne sont pas associées à une dissémination directe intravasculaire du fait de la présence d'un riche réseau sanguin de la muqueuse et de la sous-muqueuse caecale.
4. Le dernier modèle utilise l'injection intra-portale de cellules cancéreuses d'origine colique, la lignée DHD K12 établie dans le laboratoire du Dr. Martin à Dijon (cellules DHD K12 proB). Ces cellules ont été obtenues après passage sous-cutané de carcinome colique chimio-induit par la 1, 2 diméthylhydrazine chez le rat BD IX. Elles sont hautement tumorigènes en modèle syngénique par voie sous-cutanée, ou intra-portale pour l'induction de MH. Par voie intra-portale, l'injection de cellules proB permet l'obtention de MH en 4 semaines chez 100 % des rats syngéniques BD IX. Elles donnent lieu à des MH macroscopiques en 7 jours lorsque 20 millions de cellules proB sont injectées par voie intra-portale. Au troisième jour de l'injection intra-portale, les MH sont microscopiques avec quelques cellules carcinomateuses et une couronne périphérique de cellules lymphocytaires. Ce modèle court-circuite l'histoire naturelle du CCR, notamment le processus de passage dans la circulation de cellules tumorales, mais a l'avantage d'un rendement excellent puisque la totalité des rats injectés développent des MH. [394]. Dans un précédent travail (Mémoire de DEA, Ph. Zerbib, Paris XI ; 1995-96), nous avons utilisé ce modèle dans une étude pilote de faisabilité visant à traiter les MH par thérapie génique. Nous avons étudié la faisabilité d'une destruction ciblée des MH de CCR chez le rat syngénique BD IX par transfert d'un gène suicide, la thymidine kinase de l'herpès virus simplex de type 1 (TK). Ce gène TK, placé sous le contrôle d'un promoteur fort et ubiquitaire RSV (Rous Sarcoma Virus) transforme le ganciclovir (GCV) inactif en une forme triphosphate cytotoxique pour les cellules en division. Après injection d'un adénovirus recombinant (Ad) par voie veineuse périphérique, nous avons mis en évidence une efficacité anti-tumorale de la construction adénovirale Ad-pRSV-TK + GCV sur les micro-MH induites.

Au 3^{ème} jour de l'injection intra-portale de cellules proB, il existe donc des micro-métastases hépatiques, invisibles macroscopiquement. Ce modèle mime la situation de clinique humaine, où la tumeur primitive a été réséquée et la probabilité de voir se développer des MH est suffisamment forte pour proposer un traitement adjuvant (comme dans les stades III de l'UICC).

2. Résumé des travaux

Matériels et Méthodes

Cellules et animaux utilisés

Nous avons utilisé un modèle de MH décrit par Chauffert (118) et la lignée cellulaire DHD K12 proB chez des rats BD IX syngéniques mâles (Charles River, France) âgés de 9 semaines, de 250 grammes. Les cellules proB, fournies par le Dr Martin de l'Unité Inserm 517, ont été obtenues après passage sous-cutané de carcinome colique (lignée DHD/K12) chimio-induit par la 1,2-diméthylhydrazine chez le rat BD IX (Figure 12).

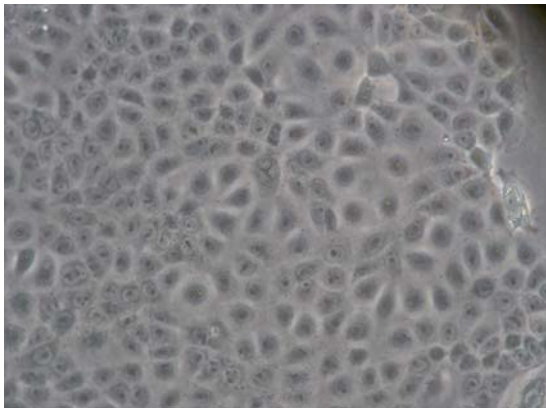


Figure 12 : Cellules DHD/K12 proB à confluence.

Les cellules proB congelées ont d'abord été mises en culture « primaire ». Après lavage dans 10 ml de HAM-F10, elles ont ensuite été centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 20°C. Le culot a été repris dans 5 ml de milieu, puis les cellules comptées en cellule de Malassez. Les cellules ont ensuite étéensemencées à raison de $0,3 \cdot 10^5$ cellules/ml par flacon de culture de 75 cm² (Falcon, France) contenant 15 ml de milieu de culture. Les flacons ont été placés dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. Le milieu de culture était changé tous les trois jours jusqu'à confluence (environ 14 jours).

A confluence, les cellules ont été lavées 2 fois avec du tampon HBSS (sans Ca²⁺, ni Mg²⁺) (Invitrogen France), puis décollées par la trypsine-EDTA (Invitrogen, France) à raison de 5 ml par flacon pendant 13 minutes à 37°C. La réaction a ensuite été neutralisée par l'ajout de 5 ml de milieu de culture à 20% de SVF. Les cellules individualisées par pipetages successifs et récupérées dans un tube Falcon ont été centrifugées à 400g pendant 5 minutes à 20°C, puis le culot remis en suspension dans 5 ml de milieu de culture et recomptées. La suspension cellulaire a alors été répartie dans de nouveaux flacons de 150 cm² à raison de 0,5.10⁵ cellules / ml ou dans des microplaques 24 puits (Nunc, Danemark) à raison de 1.10⁴ cellules / ml par puit. Le milieu de culture a été complété à 30 ml par flacon et 1 ml par puit. Les flacons et les microplaques étaient placés dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂ et le milieu de culture changé tous les trois jours jusqu'à confluence (environ 7 jours). Au moment des passages, des cellules étaient cytocentrifugées (300 tours / minute, 4min) sur lames afin de réaliser différents marquages en immunocytochimie. Deux anticorps ont été utilisés : un anticorps monoclonal anti-FT humain (4509, American Diagnostica, France), et un anticorps polyclonal anti-cytokératine 20 (N-13, Santa Cruz, France). L'anticorps anti-FT a été utilisé à 10 µg / ml. Le kit VECTASTAIN elite ABC peroxydase (AbCys, France) a été utilisé pour la révélation.

Pour le marquage FT, après décongélation, les lames étaient fixées dans de l'acétone pure à 4°C. Après réhydratation dans du tampon PBS (pH 7,2, Sigma, France) les lames étaient incubées pendant 20 minutes avec du sérum de cheval (blocage des sites non spécifiques). Après avoir enlevé l'excès de sérum bloquant, l'anticorps primaire était incubé à 4°C pendant 1 nuit en chambre humide. Après 3 lavages en PBS, l'anticorps secondaire anti-souris biotinylé était déposé pendant 1 heure à température ambiante. Enfin, après l'incubation avec le complexe avidine-biotine peroxydase pendant 1 heure, la diaminobenzidine tétrachlorure (DAB, Sigma, France) permettait la révélation. Une contre coloration à l'hématoxyline de Gill diluée au 20ème était réalisée. Les lames étaient ensuite déshydratées par des bains successifs d'alcool (75°, 95° et absolu), et luttées avec du clearium®.

Pour le marquage cytokératine 20, le blocage des sites non spécifiques a été réalisé par du sérum de lapin (AbCys, France) à 1,5%, l'anticorps polyclonal anti-cytokératine 20 a été utilisé à 2,5 µg / ml et l'anticorps secondaire était un anti-chèvre biotinylé (AbCys, France). La révélation était faite comme précédemment.

L'activité FT a été déterminée par une méthode amidolytique utilisant un substrat chromogène (le S2765) spécifique du facteur Xa. Le facteur Xa a réagit avec le S2765 qui a été clivé en deux composés dont un chromophore de couleur jaune. L'intensité de la coloration a été proportionnelle à la quantité de S2765 dégradé, donc proportionnelle à la quantité de Xa et donc à la quantité de FT exprimé, dans un système où le facteur X était en

excès. La détection a été faite par mesure de la densité optique à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Arbitrairement, la valeur de 1000 U de FT a été attribuée à 1 ml de thromboplastine humaine (thromborel, Behring). Les tests ont été réalisés dans une microplaque sur 50 µl de thromborel dilué ou du lysat cellulaire (incubation 2 minutes), 50 µl de CaCl₂ 0,25M (incubation 3 minutes), 50 µl de PPSB (apport du FVII et FX, laboratoire de fractionnement et des biotechnologiques, France), (incubation 3 minutes), et 50 µl de substrat chromogène S-2765. Au final, l'activité était exprimée en mU de FT par mg de protéines. Le dosage des protéines totales était réalisé par la technique de Bradford. Un test de neutralisation avec un anticorps monoclonal anti-FT humain était réalisé (4508, American Diagnostica, France).

Pour déterminer la possibilité d'une surexpression du FT par les cellules proB, les cellules, mises en culture en plaque 24 puits, ont été sevrées en SVF pendant 48 heures puis stimulées par différents agents inducteurs (bFGF, SVF 20%, SVF 20%+LPS, LPS) pendant 16 heures, et également placées en hypoxie.

Modèles de tumeur

Nous avons utilisé 2 modèles tumoraux : un modèle sous-cutané, et un modèle de MH. Les rats étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale (0,2 ml /100g) d'un mélange de 3,75 ml de kétamine (100 mg / ml) (Panpharma, France), de 0,5 ml de xylazine (100 mg / ml) (Rompun, Bayer, France) complété avec 5,75 ml d'eau stérile.

Dans le modèle sous-cutané, 1 million de cellules DHD/K12/proB ont été injectées dans le flanc de l'animal (figure 13). Ce modèle donne lieu à des tumeurs d'environ 1ml en 40 jours.

Dans le modèle de MH, les rats ont été laparotomisés dans des conditions d'asepsie chirurgicale. Le foie était refoulé en haut et en dehors, l'intestin grêle et le colon repoussés en bas et à gauche de l'animal. La veine porte était ainsi exposée et ponctionnée pour l'injection de 20 millions de cellules DHD/K12/proB (Figure 14). L'hémostase du point de ponction était réalisée par application d'hémostagène (surgicel, Ethicon, France). La paroi abdominale était ensuite refermée en deux plans. Dans ce modèle, des micrométastases ont été présentes au 3ème jour de l'injection intra-portale, évoluant dans tous les cas vers une dissémination métastatique massive dans le foie à J 15 puis d'autres organes à J 30. Les MH ont été macroscopiques au 7ème jour de l'injection intra-portale.

Dans les deux modèles, une analgésie post-opératoire immédiate a été assurée par une injection intra-musculaire de 20 mg/kg de nefopam (Acupan, Biocodex, France).

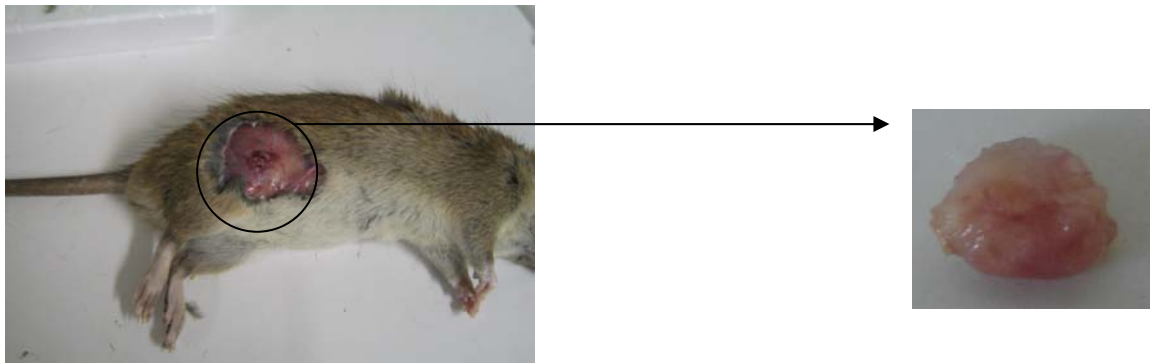


Figure 13 : Tumeur sous cutanée à J 14 chez le rat BD IX.

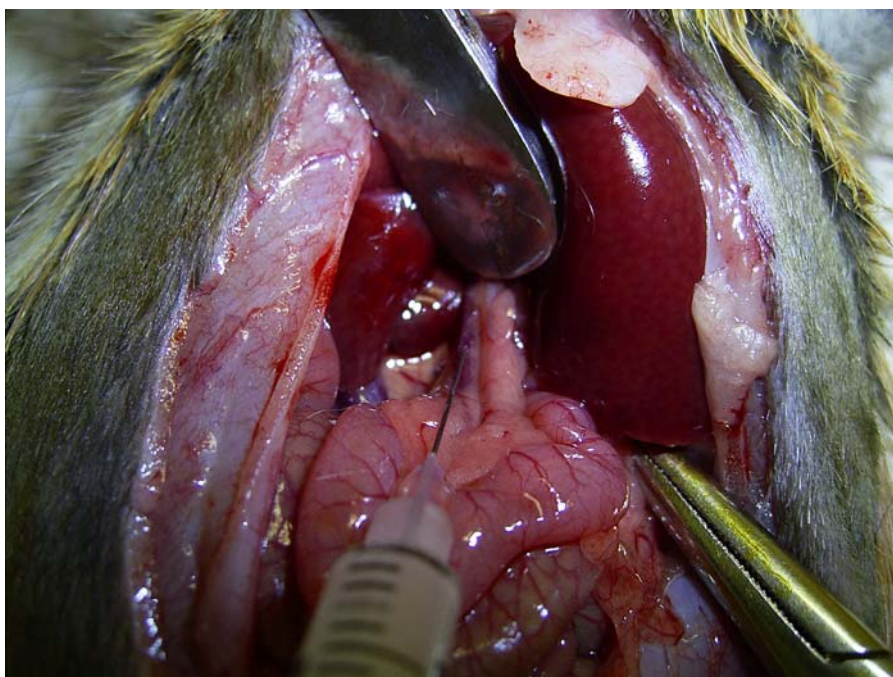


Figure 14 : Injection intra-portale des cellules proB chez le rat BD IX.

Protocoles d'utilisation du FFR-VIIa et sacrifice des animaux

Le FFR-VIIa nécessaire à la réalisation de ce protocole nous a été gracieusement fourni par le laboratoire Novo-Nordisk (Danemark).

La posologie de FFR-FVIIa a été la plus forte utilisée chez les rats sans que ne surviennent de complications hémorragiques (Données de NovoNordisk).

Dans une première série d'expérimentations, le FFR-FVIIa a été utilisé selon un protocole adjuvant, débutant à J 3 après l'injection des cellules tumorales (Figure 15), et dans une

seconde série d'expérimentations, selon un protocole palliatif, débutant à J 7 après l'injection (Figure 16).

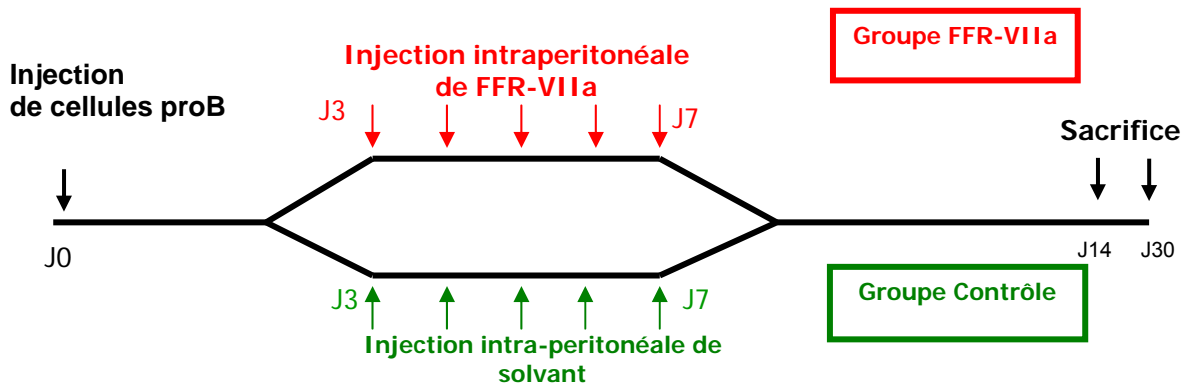


Figure 15 : Traitement par le FFR-VIIa selon le protocole adjuvant.

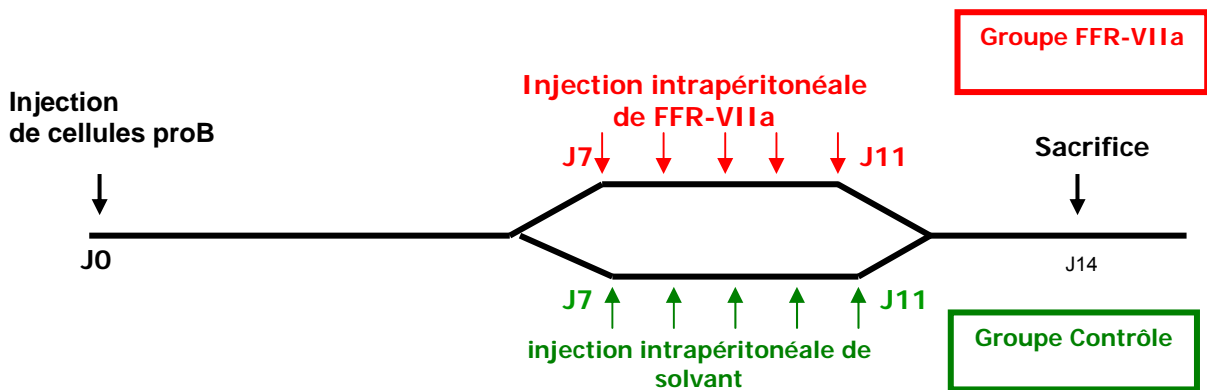


Figure 16 : Traitement par le FFR-VIIa selon le protocole palliatif.

Concernant le modèle de MH, le protocole adjuvant a mimé la situation clinique humaine où la tumeur primitive colique a été réséquée et où la probabilité de voir se développer des MH est forte (100 % des cas dans notre modèle expérimental). Dans le protocole palliatif, des MH se sont déjà développées. Concernant le modèle sous-cutané, le protocole palliatif débute à un moment où la croissance tumorale est déjà macroscopiquement visible, et où existe une angiogénèse tumorale (Figure 17).

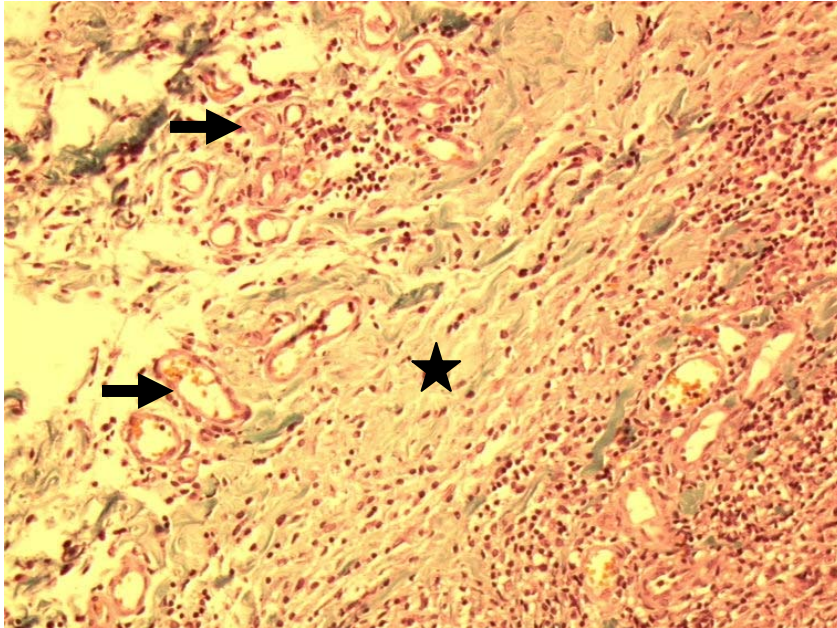


Figure 17 : Coupe histologique (coloration MGG) d'une tumeur sous cutanée.

L'infiltrat de cellules tumorales (★) contient de nombreuses cellules inflammatoires ainsi que des vaisseaux dont certains sont perfusés (➡).

Dans les 2 protocoles, le FFR-VIIa a été injecté par voie intra-péritonéale à la dose de 10 µg / g / 24 heures pendant 5 jours consécutifs. Les rats témoins ont reçu en intra-péritonéal le même volume de solvant stérile, remplaçant le FFR-VIIa.

Deux séries de rats ont été sacrifiées respectivement au 14ème et au 30ème jour de l'injection intra-portale de proB pour examen macroscopique et histologique du foie, du péritoine, de la rate et des poumons.

Au moment du sacrifice, les rats étaient anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique dilué (1ml dans 3ml de sérum physiologique). Les rats étaient ensuite euthanasiés par une injection intra-péritonéale de 1 ml de pentobarbital sodique pur (Sanofi, France). Suite au sacrifice une première analyse visuelle permettait de déterminer d'un point de vue macroscopique la présence de métastases sur le foie, les poumons ou la rate. Ces organes étaient ensuite prélevés rapidement.

Les organes ont été inclus en paraffine pour des coupes de 7µm tous les 200µm puis colorés par MGG trichrome. Cette coloration a permis un décompte facile des vaisseaux tumoraux.

Analyse statistique

Les comparaisons ont été effectuées par test de Student. Les valeurs ont été exprimées en moyenne +/- écart type. Le test χ^2 a été utilisé pour la comparaison de 2 ou plusieurs variables nominales. Ces analyses, réalisées grâce au logiciel Statview (Abacus Concept, USA), ont été considérées comme significatives quand $p < 0,05$.

Résultats

I- Résultats in vitro

Les cellules proB ont exprimé la cytokératine 20 et le FT à l'état de base (Figure 18). Aucune augmentation de l'activité FT n'était observée après 16 heures d'incubation en présence d'agents stimulants (Figure 19) ni d'hypoxie.

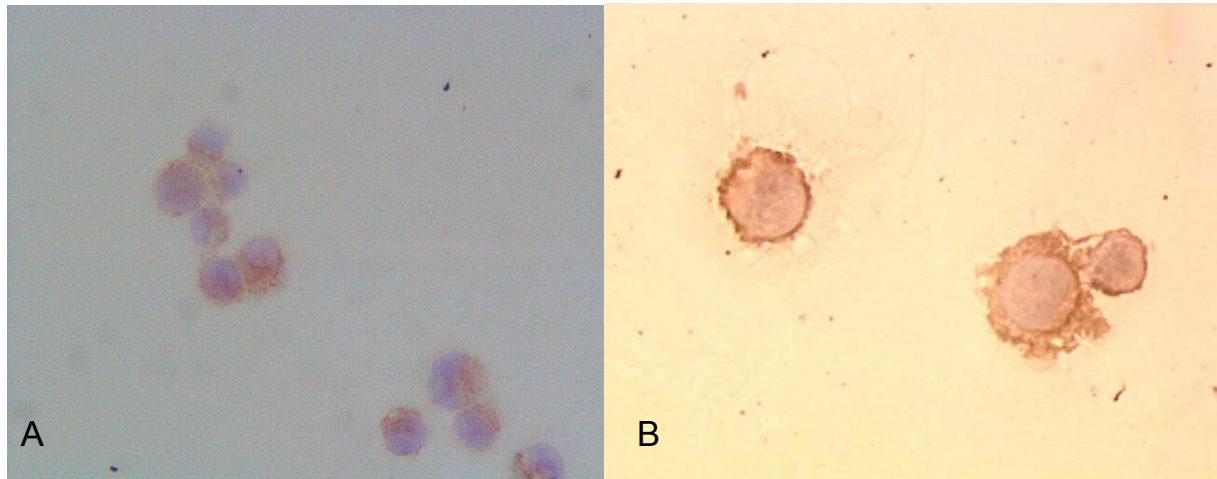


Figure 18 : Expression de la cytokératine 20 (A) et du FT (B) par les cellules proB.

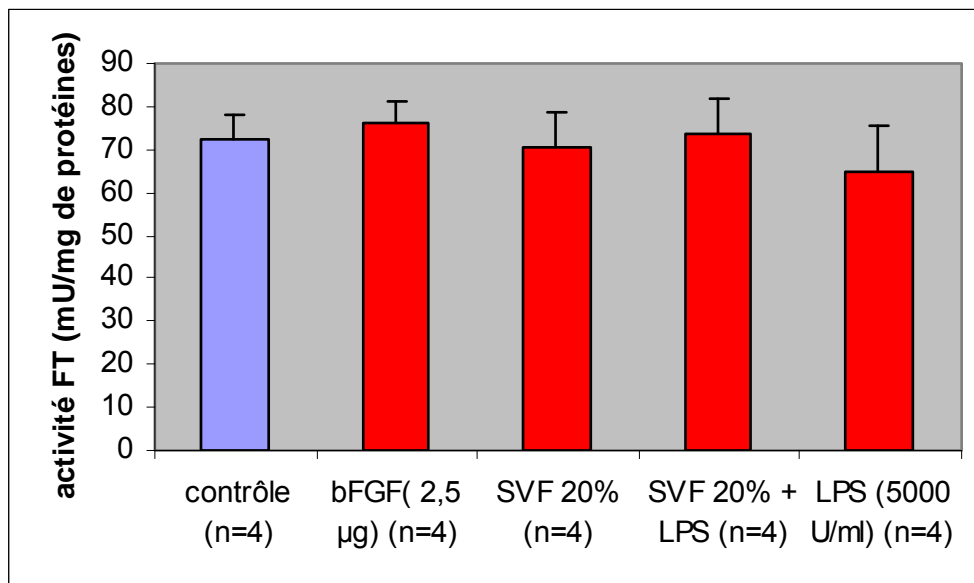


Figure 19 : Activité FT des cellules proB en fonction de différents inducteurs.

II- Modèle sous cutané

II-1- Protocole adjuvant

Dix rats ont été inclus dans le groupe traité et 10 dans le groupe contrôle.

Macroscopiquement, aucune différence significative n'a été observée entre les groupes traité et contrôle, que ce soit pour la taille de la tumeur à J 14 (contrôles : 7 ± 2 mm versus traités : 6.5 ± 1.5 mm). L'histologie n'a pas montré de différence entre les groupes (Trichrome de masson) (Figure 20). Il n'a pas non plus été observé de différence en ce qui concerne le nombre de vaisseaux tumoraux (contrôles: 219 ± 12 , traités : 212 ± 17). De ce fait, aucun rat n'a été sacrifié à J 30.

II-2- Protocole palliatif

Etant donné l'absence d'effet anti-tumoral dans le groupe adjuvant, il n'a pas été réalisé de traitement palliatif dans ce modèle.

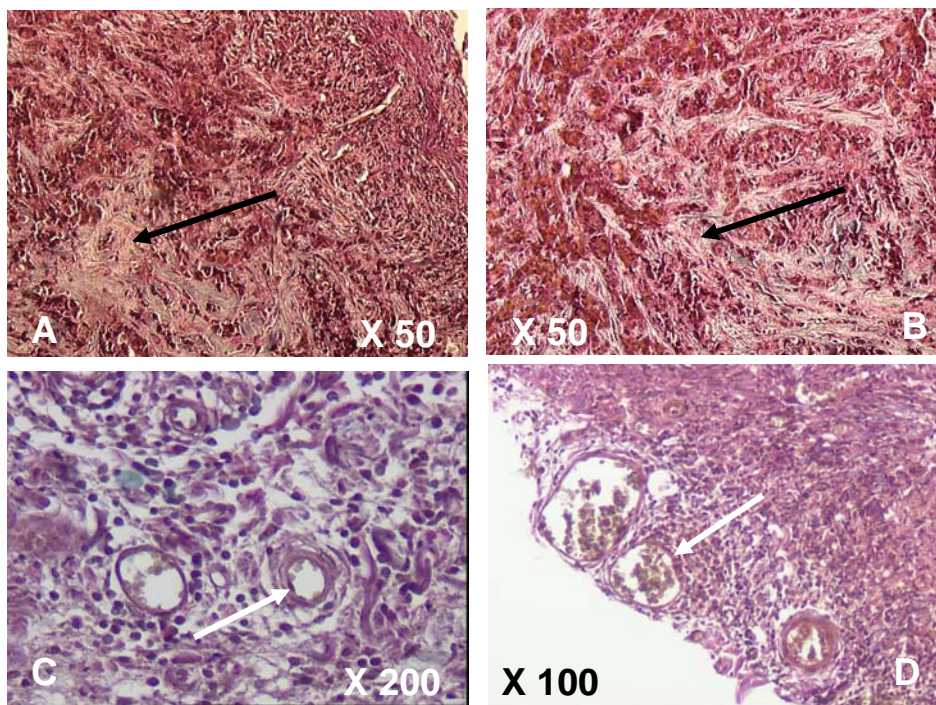


Figure 20 : Coupes histologiques de tumeur sous-cutanée chez un rat contrôle (A et C) et un rat FFR-VIIa (B et D) à J14. Les flèches noires indiquent les travées de fibrose, les flèches blanches les vaisseaux.

III- Modèle de MH

III-1- Groupe « adjuvant » (début du traitement à J3)

Vingt-cinq rats (11 témoins, 14 traités par le FFR-VIIa) ont été sacrifiés au 14ème jour de l'induction métastatique. Dix des 11 rats témoins étaient porteurs de MH macroscopiques. Parmi les 14 rats traités, 12 étaient indemnes de prolifération tumorale. Les 2 derniers présentaient les mêmes MH macroscopiques que les rats témoins. Le poids des rats témoins lors du sacrifice était inférieur au poids de départ (252 +/- 26 g versus 294 +/- 44 g) sans que la différence soit significative ($p=0,2$). Le poids des rats traités était identique au poids de départ (259 +/- 20 g versus 261 +/- 27 g). Nous n'avons pas observé d'effet indésirable du FFR-VIIa chez les rats traités, en particulier pas de phénomène hémorragique. Les poumons, la rate et le péritoine étaient indemnes de prolifération tumorale chez les traités et chez les témoins. Les études histologiques ont confirmé les observations macroscopiques (Figure 21).

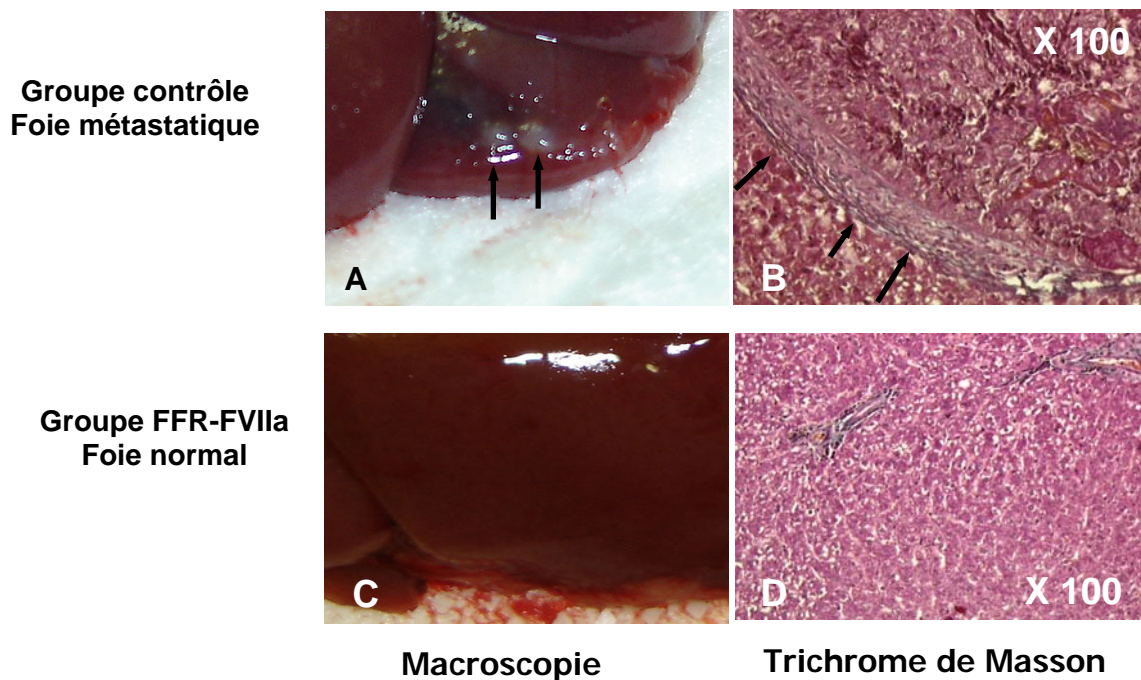


Figure 21 : Foie de rat contrôle (A et B) et de rat traité (C et D). Les flèches indiquent les métastases hépatiques et la limite tumorale sur les coupes histologique.

Une deuxième série de 7 rats (2 témoins, 5 traités par le FFR-VIIa) a été sacrifiée au 30ème jour de l'induction métastatique. Les rats témoins étaient porteurs de MH macroscopiques associées à une carcinose péritonéale (Figure 22). Quatre des 5 rats traités étaient indemnes de prolifération métastatique. Les rats témoins ont maigri sans que la différence soit significative (262 +/- 2 g versus 280 +/- 6 g ; p = 0,054) et les rats traités ont pris du poids (287 +/- 24 g versus 265 +/- 21 g ; p = 0,17).

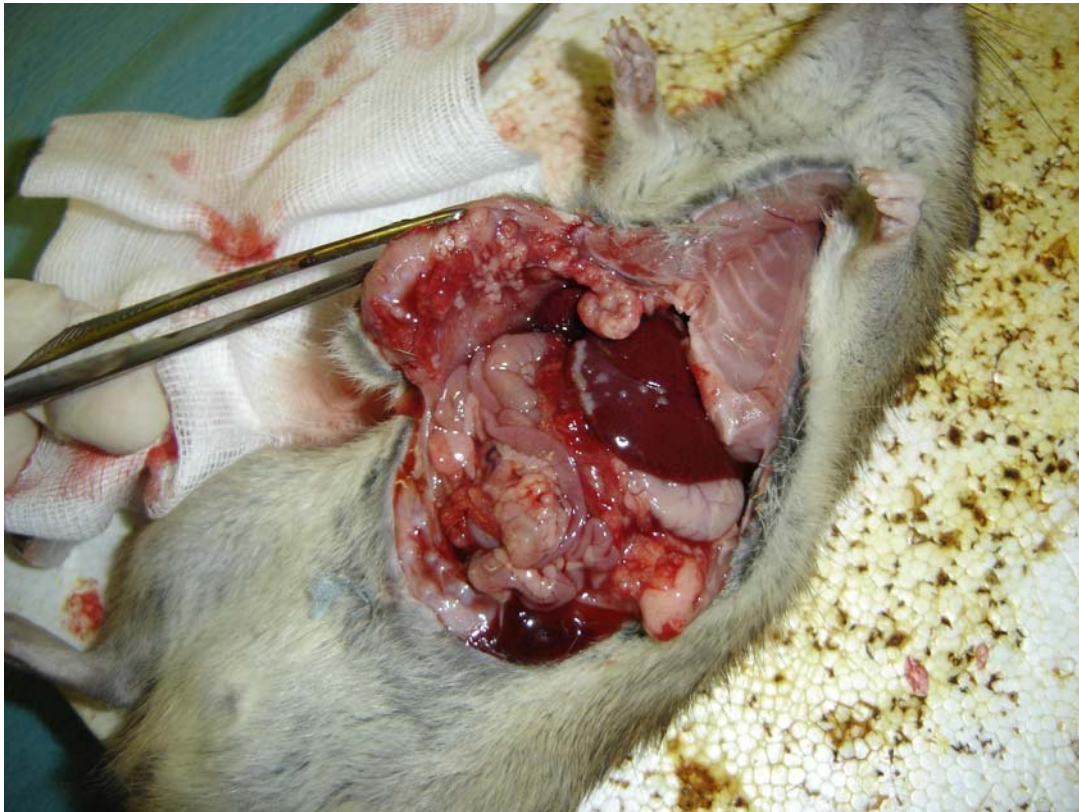


Figure 22 : Métastases hépatiques et carcinose péritonéale chez un rat témoin sacrifié à J 30.

II-2- Groupe « palliatif » (début du traitement à J7)

Nous avons inclus 9 rats (5 témoins et 4 traités par le FFR-VIIa). Tous les rats étaient porteurs des mêmes MH lors du sacrifice au 14ème jour de l'induction métastatique. Nous n'avons pas observé de différence histologique entre les MH des rats traités et des rats témoins en particulier, la densité en vaisseaux perfusés au sein des MH était identique. Nous n'avons donc pas observé d'effet anti-tumoral du FFR-VIIa en situation « palliative » lorsque les MH étaient déjà présentes.

Une partie de ces travaux ont été réunis dans l'article qui suit.

Category: Oncology

Inhibition of tissue factor-factor VIIa proteolytic activity blunts hepatic metastasis in colorectal cancer

Ph Zerbib, MD^{1,2,3}, A Grimonprez^{1,2,3}, D Corseaux, PhD^{1,2,3}, F Mouquet, MD, PhD^{1,2,3}, B Nunes, MD³, LC Petersen, MS, PhD, DSc⁴, S Susen, MD, PhD^{1,2,3}, A Ung¹, M Hebbbar, MD, PhD³, FR Pruvot, MD³, JP Chambon, MD³, B Jude, MD, PhD^{1,2,3}

¹Inserm ERI-9, Faculté de Médecine F-59045 Lille, France; ² Université de Lille 2, EA2693, F-59045, Lille, France, ³ Centre Hospitalier Régional Universitaire, Département de Chirurgie Digestive and Institut d'Hématologie-Transfusion, Lille, F-59037, France; ⁴ Haemostasis Biology, Novo Nordisk A/S, Denmark.

Corresponding author:

Dr Philippe Zerbib,

Département de Chirurgie Digestive et Transplantation,

Centre Hospitalier Régional Universitaire,

Hôpital Huriez, 59037 Lille cedex

France

Tel: 00 (33) 3 20 44 43 96

Fax: 00 (33) 3 20 44 59 89

p-zerbib@chru-lille.fr

Abstract

Background Expression of the principal initiator of coagulation, tissue factor (TF), by colorectal cancer (CRC) cells is an important mediator of angiogenesis and metastasis. Binding of factor VIIa (FVIIa) to TF and TF/FVIIa activity is obligatory for this process and we hypothesized that inhibition of the TF pathway by active site-blocked FVIIa (FFR-FVIIa) may prevent the development of hepatic metastasis in CRC.

Materials and Methods Rat tumoral cells (DHDK12 proB cells) expressing high levels of TF were injected in the portal vein in syngenic BDIX rats. Rats received intraperitoneal injection of either FFR-FVIIa, from day 3 to day 7 (adjuvant treatment) (n = 19) or of solvent buffer (n = 18) (control group). Additionally, cancer cells were infused subcutaneously in 20 other rats, which were assigned to FFR-FVIIa adjuvant treatment (n = 10), or buffer treatment (n = 10). Macroscopical and histological analysis was performed at day 14.

Results In the control group, infusion of cancer cells resulted in development of macroscopical hepatic tumours in 17 / 18 rats. In the adjuvant FFR-FVIIa group, macroscopical hepatic tumours were visible on the liver surface in 3 / 19 rats (p = 0.002). All rats with subcutaneous injection of proB cells exhibited macroscopical tumours, with no significant difference between the control and the treated ones.

Conclusion Inhibition of the proteolytic activity of TF-FVIIa complex blunted hematogenous hepatic metastasis and is a relevant target for the prevention of hepatic metastasis in CRC. TF-blocking agents should be investigated as adjuvant treatment in this setting.

Key words

Colorectal cancer, tissue factor, hepatic metastasis, experimental model

Introduction

Occurrence of hepatic metastasis is the leading cause of death in colorectal cancer (CRC), making their prevention a major challenge [395]. Current available adjuvant therapies aiming at preventing hepatic metastasis, such as 5FU-leucovorin, irinotecan or oxaliplatin, are clearly insufficient, making the development of new efficient adjuvant agents highly desirable [396]. Hyper-coagulability and angiogenesis are involved in cancer progression, through up-regulation of tissue factor (TF), the cellular receptor of coagulation factor VII (FVII), and the principal initiator of the coagulation cascade [261]. After binding of FVII to TF, the TF-FVIIa complex induces proteolytic activation of factor X and generation of thrombin, leading to platelet activation and fibrin clot formation. TF-FVIIa also induces activation of protease-activated receptors (PAR), and more specifically PAR-2 [397]. TF, hereby, acts as a cell receptor which mediates intracellular signals and regulates gene expression [398]. TF is expressed by most CRC cells, and this aberrant expression is proposed to be directly linked to oncogenic mutations of K-ras oncogene and loss of p53 tumour suppressor gene in human CRC cells [350]. Several lines of evidence indicate that TF is a major actor in hepatic metastatic dissemination of CRC cells: 1) TF expression in primary tumours was shown to be significantly higher in patients with than without liver metastasis [336, 337, 399, 400]; 2) significantly higher TF expression was observed in tumour cells from hepatic metastasis than in the corresponding primary tumour cells [338, 400]; 3) The overall survival rate of patients with CRC was shown to be significantly lower among patients with TF positive rather than with TF negative tumour cells [337]; 4) TF expression was found to be significantly more frequent on tumour cells from patients with Dukes C disease compared with patients with Dukes A and B disease [336]. Moreover, TF gene silencing has been demonstrated to inhibit cancer progression and metastasis in vivo [401]. Several previous experimental reports suggest that inhibition of TF-FVIIa proteolytic activity may reduce tumour growth and

pulmonary metastasis [341, 390-392]. Still it is important to further examine to what extent *in vivo* inhibition of TF-FVIIa activity is capable of inhibiting hepatic engraftment of CRC cells. We therefore analyzed the effects of inhibiting TF-FVIIa complex formation and proteolytic activity in a rat model of hepatic metastasis of CRC. This was achieved through treatment with active site-inactivated factor VIIa (FFR-FVIIa), which exerts its effects by limiting the formation of functionally active TF-FVIIa complexes by directly competing with plasma FVIIa for available TF sites on cell surfaces [402].

Methods

FFR-FVIIa

Phe-Phe-Arg-chloromethyl ketone inactivated FVIIa (FFR-FVIIa) was prepared as described [403].

Cell culture and characterization

DHD/K12/ TRb (proB) cells, a tumour cell line established from 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinoma in BDIX rats (a kind gift from B. Chauffert, Inserm U 517, France) were used in this study. Cells ($0.3 \cdot 10^5$ cells/ml) were cultured in HAMF10 Glutamax (*Invitrogen*) with 20% fetal calf serum (*Biowest*), HEPES buffer (20mM) (*Invitrogen*), penicillin-streptomycin and fungizone (*Invitrogen*), bovine insulin (*Roche*), and aminoacids (*Invitrogen*) in 75 cm² flasks (*Falcon*), at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. At confluence (after approximately 14 days), culture medium was removed, cells were washed in HBSS buffer, removed by trypsin-EDTA during 10 minutes at 37°C, and cultured in 150 cm² flasks ($0.5 \cdot 10^5$ cells/ml) for 7 days, or in microplaques ($1 \cdot 10^4$ cells/mL).

TF expression by proB cells was analyzed through 1) immunocytochemical analysis on cryopreserved cytocentrifuged slides, using monoclonal anti human TF (10µg/ml) (4509, *American Diagnostic*), revealed with VECTASTAIN *elite* ABC peroxydase (*Vector*);

Antibodies were applied for 1 night at +4°C in a humidified chamber; A negative control (IgG isotype) was included. Color was developed for peroxidase by diaminobenzidine, and counterstained with Gill's hematoxylin; 2) functional analysis of TF activity on cell lysates with the use of a modified amidolytic assay derived from the Carson's method [404]; briefly cells were lysed by addition of 15µl of NOG (N Octyl β D Glucopyranoside, *Sigma*) in 100 µl of cell suspension; lysed cell suspensions (50 µl) were incubated at 37°C, mixed with 0.025 M CaCl₂ (50 µl) and prothombin concentrate complex (*Laboratoire Français de Fractionnement et des Biotechnologies*) as a source of FVII (50 µl, 3 IU/mL); after addition of 50 µl of the chromogenic substrate S2765 (*Biogenic*), changes in optical density (405 nm) were quantified; the maximum speed was converted to units of TF activity from log-log plots of serial dilutions of Recombinant TF Ortho Recombiplastin Hemoliance (*Ortho Diagnostic Systems*); arbitrarily, 1mL of recombiplastin was assigned to a value of 1000 mU and results were expressed as mU /mg of proteins, after determination of the protein content of cell suspensions by the Bradford technique. In order to study the TF response of proB cells to usual inducers of TF expression (i.e. agents interfering with the Lipopolysaccharide (LPS)-Responsive Element and the Serum Responsive Element in the TF promoter) [261], cells in microplaques were starved for 48 hours before stimulation by LPS (5000 EU/mL, *Escherichia coli* 055:B5 *Sigma*) or basic fibroblast growth factor (bFGF) (2,5 µg/mL, *Sigma*) or fetal calf serum (FCS) (20%, *Biowest*) or both for 16 hours. Moreover, inhibition of rat TF activity in CRC cells was achieved, by adding (immediately before TF activity assay) either antibody against human TF (*American Diagnostica 4508*) or FFR-FVIIa (84ng/mL).

Experimental model of hepatic colorectal metastasis

The experimental model consisted in proB cell direct injection in the portal vein of 9 week old male rats with the same genetic background as that of proB cells (BD IX) (*Charles River*) (weight 200 to 250 grammes). Animals were given free access to standard laboratory chow

and water throughout the experiment. All experiments were conducted in accordance with the European Communities Council Directive (86/609/EEC).

Anesthesia was performed through an intraperitoneal injection (0.2 ml /100g) of ketamine (100mg/ml) (*Panpharma*) and xylazine (100mg/ml) (*Rompun, Bayer*) in sterile water. After surgical laparotomy and exposure of the portal vein, $20 \cdot 10^6$ proB cells were injected in the portal vein, as previously described [394] (Figure 1). Punction point hemostasis was realized by application of surgical hemostatic sponge (*Surgicel, Ethicon*). Abdominal wall was sutured. Post-operative analgesia was performed by intramuscular injection of nefopam (*Acupan, Biocodex*) (20 mg/kg). Previous reports have demonstrated that this model leads to microscopical hepatic metastasis in 3 days, macroscopical hepatic metastasis in 7 days, and to multivisceral dissemination of cancer cells and death within 36 to 68 days [394].

Experimental model of subcutaneous tumour

In order to further analyze the effects of TF inhibition on tumour development, a subcutaneous tumour model was used in other BDIX rats. Cancer proB cells were infused subcutaneously in the dorsal area ($1 \cdot 10^6$ cells per injection). Rats were sacrificed after 14 days, under the same anaesthesia procedure.

FFR-FVIIa treatment schedule

Rats were assigned either to FFR-FVIIa treatment, infused intraperitoneally (10 µg/g) (treatment group) or to solvent vehicle injection (control group).

In order to reproduce the human clinical stage III of UICC classification, where the primitive tumour has been removed and adjuvant therapy is necessary because of high probability of hepatic metastasis, infusions of FFR-FVIIa or of solvent buffer were realized once a day for 5 days, from day 3 to day 7 after cell injection (Figure 2).

The dose chosen for FFR-FVIIa was close to the maximal dose, with respect to the tolerance of the product, as indicated by previous experiments in rats showing a risk of bleeding

complications at doses higher than 10 µg/g. After intraperitoneal injection of 10 µg/g of FFR-FVIIa, both protein (ELISA assay) and anticoagulant effect (clotting time) are detectable 0.5 to 1 hour after injection, and reach maximal levels of about 2.5 µg/ml after 2 to 3 hours (unpublished data, LCP). In rats, FFR-FVIIa is cleared from the circulation with a half life of 1.3-1.4 hours similar to those obtained with FVIIa and FVII [405].

Follow up and macroscopical observation

After 14 days, rats were anesthetized by an intraperitoneal injection of 1mL of a 1/3 solution of pentobarbital, and then euthanized by infusion of 1 mL of pentobarbital. Liver, spleen, gastrointestinal tract and lungs were removed and carefully examined for tumoral localization or bleeding symptoms. In the subcutaneous tumour model, the tumour was removed and measured.

Histological analysis

In each animal, liver, lungs and spleen were fixed in 4% paraformaldehyde for 48 hours, then dehydrated in alcohol and xylene, and included in paraffin. Seven µm slices were sectioned every 200µm. Slides were then deparaffined by toluen, rehydrated in alcohol and stained by Masson trichrome.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. Qualitative data were compared with the χ^2 test. Comparison for continuous variables between groups were performed using the non parametric Mann-Whitney U test. A p-value < 0.05 was required for statistical significance. All analyses were conducted using Statview software (*Abacus Concept*).

Results

TF expression by proB cells

Immunocytochemistry (Figure 3) showed that proB cells strongly expressed TF, and that this expression was mostly localized to the cell membrane. ProB cells mediated TF-dependent FX activation at a baseline activity level which was not further enhanced by stimulation with usual inducers of TF gene expression: bFGF, LPS, FCS or LPS+FCS. Addition of FFR-FVIIa or anti TF antibody to the reaction mixture immediately before assay decreased TF activity by 85% and 65 % respectively ($p < 0.01$) (Figure 4).

Effects of FFR-FVIIa in the hepatic metastasis model

Thirty seven rats underwent a portal injection of proB cells (18 rats in control group, and 19 in treatment group). The sacrifice was performed at day 14. In the control group, infusion of proB cells resulted in the development of macroscopical hepatic tumours, confirmed by histology Masson trichrome (Figure 5) in 17 out of 18 rats after 14 days, with no lung, spleen or bowel metastases. In rats treated with FFR-FVIIa, macroscopical hepatic metastasis were visible on the liver surface in 3 out of 19 rats ($p = 0.002$, *versus* control group). Histological analysis confirmed the absence of metastatic islets in the liver of the 16 rats without macroscopical hepatic metastases (Figure 5). No other cancer localizations were detected in bowel, lung or spleen. Metastases found in one single rat in the FFR-FVIIa-treatment group were similar, with respect to the topography in the liver and tumour architecture, to those observed in the control group.

Effects of FFR-FVIIa in the subcutaneous tumour model

Twenty rats received a subcutaneous injection of proB cells, and were assigned to either FFR-FVIIa treatment ($n = 10$) or placebo ($n = 10$). A tumour was macroscopically visible after 14 days in all rats, without significant differences between the control and the treatment group

(tumour diameter = 7 ± 2 mm in the control group *versus* 6.5 ± 1.5 mm in the FFR-FVIIa group, $p = ns$). Histological analysis after Masson trichrome staining showed no difference between the 2 groups, including the number of vessels present in the subcutaneous model (219 ± 12 in the control *versus* 212 ± 17 in the FFR-FVIIa group, $p = ns$) (Figure 6). General examination of the animals did not reveal any bleeding in rats treated with FFR-FVIIa, whatever tumour model.

Discussion

In this study, inhibition of the TF/FVIIa proteolytic activity significantly inhibited the development of hepatic metastases in a model of syngenic CRC, when FFR-FVIIa was injected in the very first days (day 3 to day 7) after intraportal injection of the tumour cells. By contrast, similar early administration of FFR-FVIIa after subcutaneous injection of cancer cells had no impact on tumour growth and tumoral angiogenesis. This suggests that inhibition of the proteolytic activity of TF-FVIIa inhibits early development of metastasis, whereas it is not effective on non metastatic tumour growth.

Targeting TF for cancer therapy has been tested in several earlier studies, using various cancer cell lines [341, 390]. As early as 1992, Mueller and coworkers demonstrated that inhibition of TF receptor function abolished prolonged adherence of TF expressing-melanoma cells, resulting in a significant reduction of tumour cells in the lung vasculature of SCID mice. In this model, enhancement of TF expression increased melanoma cell metastasis [406]. The same group demonstrated that formation of a catalytically active TF-FVIIa complex was required for metastasis [390]. Using Chinese Hamster Ovary (CHO) cells transfected with TF, they showed that the metastatic potential of these cells was not only dependent on TF, but also on FVIIa proteolytic activity, since systemic administration of FFR-VIIa before injecting TF-transfected CHO cells prevented pulmonary metastasis by competing with endogenous FVIIa

for binding TF. More recently, Hembrough et al have demonstrated that two inhibitors of TF-FVIIa, TFPI and rNAPc2, inhibit both primary and metastatic tumour growth in B16 melanoma mice model [341]. In line with this, a humanized anti-human TF monoclonal antibody was also recently shown to inhibit breast cancer metastasis and tumour growth in a mouse model with MDA-MB-231 human breast carcinoma cells [407]. In contrast, the inhibitory effect of FFR-FVIIa on cancer cell migration and metastatic potential was not confirmed in other studies [408, 409].

To our knowledge, this study provides the first demonstration that inhibition of the TF-FVIIa proteolytic activity by FFR-FVIIa prevents liver metastasis development of colon cancer *in vivo*. This is of clinical relevance, since in human clinical situation, the primary colon carcinoma is rarely the principal concern because of a high rate of surgical resectability. The main prognosis factor is the development of liver metastases since this development is fatal for almost all patients.

In this study, we used a well-described and reproducible experimental model, previously described by Chauffert et al [394], which closely mimics the human pathogenesis of liver metastasis. Indeed, the portal circulation provides a major route for dissemination of cancer cells, including that taken during the surgical procedure for tumour resection. An additional advantage of the present model is that it allows observation of hepatic metastasis development in immunocompetent animals. Previous observations on the effect of TF-FVIIa inhibition in animal models of cancer had been obtained in immunodeficient animals. With the present model, we could infuse colorectal tumour cells from the same genetic background as that of the host rats. As inflammatory and immune cells are known to play an important role in cancer development, inhibition of hepatic metastasis engraftment in this model by FFR-FVIIa is probably of stronger clinical relevance than in immunodeficient animals.

In the model used, seeding of hepatic metastases has been established before day 3 after CRC cells injection [394]. Evidently, FFR-FVIIa therefore impaired the early development of micrometastases although the underlying mechanism for this inhibition is unclear. However, the effect was clearly an interference within the early steps of the metastatic process in the liver, since FFR-FVIIa, at the same dose, did not impair tumour growth and angiogenesis in the subcutaneous model. As FFR-FVIIa was used at the maximal dose with respect to potential bleeding complications, it seems unlikely that higher doses could be used to improve inhibition of *in situ* tumour development.

Altogether, these findings suggest that FFR-FVIIa acts through interference in the process of metastasis engraftment and development. An important and early step during formation of distant metastasis may be the arrest of circulating tumour cells within the host organ, through mechanical entrapment and receptor-specific “seed and soil” adhesions. However, mechanical arrest caused by size restriction is less important than specific adhesive interactions between cells and microvasculature of the host organs [410]. The TF-FVIIa complex regulates cell adhesion and migration [308, 390], through increasing the local generation of coagulation proteases which induce fibrin formation [389]. It also activates intracellular signalling pathways by cleavage of protease-activated receptors [411] and promotes cell survival [313]. To be effective, these processes require catalytically active FVIIa [412]. Our results could thus be explained by an inhibition of tumour cells adhesion or migration, and also by interference of FFR-FVIIa with clot formation and cell survival within the tumour cell emboli, independent of a specific intracellular response induced by TF/FVIIa.

The specific clinical setting when active site-inhibited FVIIa might be beneficial remains to be precisely defined. Our results suggest that this agent could be used in CRC with high metastatic risk such as UICC stage III tumours. The pathological stage of a tumour is definitely known only after surgical resection. We thus speculate that FFR-FVIIa could be

injected as an adjuvant treatment in the days following surgical resection, as soon as the UICC stage ≥ 3 is known.

In conclusion, this study brings evidence that FFR-FVIIa, an inhibitor of the proteolytic activity of TF-FVIIa, is capable of attenuating hepatic progression of colorectal cancer, when administered at an early stage of metastasis development. At the dose used, this effect was not associated with bleeding complications or any other observed adverse effect. These results indicate that the proteolytic activity of the TF-FVIIa complex is a relevant target for the prevention of hepatic metastases of colorectal cancer, and suggest that TF-FVIIa inhibiting agents should be investigated as adjuvant treatment in this setting.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) ERI-9, Conseil Régional Nord Pas de Calais, FEDER, and University of Lille 2, EA 2693, France. This work was realized in Institut Federatif de Recherche 114. We are indebted to Bertrand Vaast and Florence Welele for expert technical assistance.

Conflict of interest: None

Figure legends


Figure 1: Intraportal injection of proB cells with 30 gauge needle.  : Liver.

Figure 2: Study design, treatment schedule.

Figure 3: Expression of TF by proB cells.

Figure 4: TF activity expressed in proB cells alone (control), and after incubation with LPS (5000 EU/mL), bFGF (2.5 μ g), and/or FCS (20%) for 16 hours, and inhibition by FFR-FVIIa or anti human TF antibody, added at the time of chromogenic assay.

Figure 5: Macroscopical and histological (Masson trichrome coloration) examination of the liver. In the control group, metastases are visible macroscopically (A) and histologically (B)

(Black arrows indicate metastasis boundaries). By contrast, in the treated group, no metastasis is visible macroscopically (C) and histologically (D).

Figure 6: Histological examination (Masson trichrome) of subcutaneous tumours in control group (A and B) and in treated FFR-VIIa Group (C and D). White arrows indicate fibrosis, and black arrows indicate tumour vessels.

References

1. Pawlik, T. M., Schulick, R. D., and Choti, M. A. Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist*. **13**: 51-64, 2008.
2. Majer, M., Akerley, W., and Kuwada, S. K. Oncologists' current opinion on the treatment of colon carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem*. **7**: 492-503, 2007.
3. Eilertsen, K. E., and Osterud, B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis*. **15**: 521-538, 2004.
4. Hjortoe, G. M., Petersen, L. C., Albrektsen, T., Sorensen, B. B., Norby, P. L., Mandal, S. K., Pendurthi, U. R., and Rao, L. V. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood*. **103**: 3029-3037, 2004.
5. Chen, J., Bierhaus, A., Schiekofer, S., Andrassy, M., Chen, B., Stern, D. M., and Nawroth, P. P. Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost*. **86**: 334-345, 2001.
6. Yu, J. L., May, L., Lhotak, V., Shahrzad, S., Shirasawa, S., Weitz, J. I., Coomber, B. L., Mackman, N., and Rak, J. W. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood*. **105**: 1734-1741, 2005.
7. Lwaleed, B. A., Chisholm, M., and Francis, J. L. Urinary tissue factor levels in patients with breast and colorectal cancer. *J Pathol*. **187**: 291-294, 1999.
8. Lykke, J., and Nielsen, H. J. The role of tissue factor in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. **29**: 417-422, 2003.
9. Nakasaki, T., Wada, H., Shigemori, C., Miki, C., Gabazza, E. C., Nobori, T., Nakamura, S., and Shiku, H. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol*. **69**: 247-254, 2002.
10. Seto, S., Onodera, H., Kaido, T., Yoshikawa, A., Ishigami, S., Arii, S., and Imamura, M. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer*. **88**: 295-301, 2000.
11. Shigemori, C., Wada, H., Matsumoto, K., Shiku, H., Nakamura, S., and Suzuki, H. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost*. **80**: 894-898, 1998.
12. Yu, J. L., May, L., Klement, P., Weitz, J. I., and Rak, J. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost*. **30**: 21-30, 2004.
13. Amirkhosravi, A., Meyer, T., Chang, J. Y., Amaya, M., Siddiqui, F., Desai, H., and Francis, J. L. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost*. **87**: 930-936, 2002.
14. Hembrough, T. A., Swartz, G. M., Papathanassiou, A., Vlasuk, G. P., Rote, W. E., Green, S. J., and Pribluda, V. S. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res*. **63**: 2997-3000, 2003.
15. Hu, Z., and Garen, A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 12180-12185, 2001.
16. Mueller, B. M., and Ruf, W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest*. **101**: 1372-1378, 1998.
17. Rao, L. V., and Ezban, M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. *Blood Coagul Fibrinolysis*. **11 Suppl 1**: S135-143, 2000.

18. Sorensen, B. B., Persson, E., Freskgard, P. O., Kjalke, M., Ezban, M., Williams, T., and Rao, L. V. Incorporation of an active site inhibitor in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *J Biol Chem.* **272**: 11863-11868, 1997.
19. Carson, S. D. Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb Res.* **47**: 379-387, 1987.
20. Chauffert, B., Shimizu, T., Caignard, A., Hammann, A., Genne, P., Pelletier, H., and Martin, M. S. Use of a specific monoclonal antibody for studying the liver metastatic invasion of a rat colon cancer. *In Vivo.* **2**: 301-305, 1988.
21. Ghrib, F., Leger, P., Ezban, M., Kristensen, A., Cambus, J., and Boneu, B. Anti-thrombotic and haemorrhagic effects of active site-inhibited factor VIIa in rats. *Br J Haematol.* **112**: 506-512, 2001.
22. Mueller, B. M., Reisfeld, R. A., Edgington, T. S., and Ruf, W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 11832-11836, 1992.
23. Ngo, C. V., Picha, K., McCabe, F., Millar, H., Tawadros, R., Tam, S. H., Nakada, M. T., and Anderson, G. M. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *Int J Cancer.* **120**: 1261-1267, 2007.
24. Ott, I., Weigand, B., Michl, R., Seitz, I., Sabbari-Erfani, N., Neumann, F. J., and Schomig, A. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation.* **111**: 349-355, 2005.
25. Versteeg, H. H., Schaffner, F., Kerver, M., Petersen, H. H., Ahamed, J., Felding-Habermann, B., Takada, Y., Mueller, B. M., and Ruf, W. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood.* **111**: 190-199, 2008.
26. Schluter, K., Gassmann, P., Enns, A., Korb, T., Hemping-Bovenkerk, A., Holzen, J., and Haier, J. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am J Pathol.* **169**: 1064-1073, 2006.
27. Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., and Ruf, W. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol.* **140**: 1241-1253, 1998.
28. Palumbo, J. S., Kombrinck, K. W., Drew, A. F., Grimes, T. S., Kiser, J. H., Degen, J. L., and Bugge, T. H. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood.* **96**: 3302-3309, 2000.
29. Belting, M., Ahamed, J., and Ruf, W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **25**: 1545-1550, 2005.
30. Sorensen, B. B., Rao, L. V., Tornehave, D., Gammeltoft, S., and Petersen, L. C. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood.* **102**: 1708-1715, 2003.
31. Cirillo, P., Cali, G., Golino, P., Calabro, P., Forte, L., De Rosa, S., Pacileo, M., Ragni, M., Scopacasa, F., Nitsch, L., and Chiariello, M. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation.* **109**: 2911-2916, 2004.

3. Discussion

Cette étude démontre donc que l'inhibition de l'activité protéolytique du complexe FT-FVIIa prévient le développement de MH dans ce modèle. L'inhibiteur utilisé étant très spécifique, ces résultats suggèrent que l'activité protéolytique du complexe FT-FVIIa est une cible thérapeutique potentielle dans les MH du cancer colorectal. Par contre, le même traitement réalisé après injection sous-cutanée de cellules tumorales n'empêche pas et ne modifie pas le développement des tumeurs.

En utilisant des cellules cancéreuses autres que des cellules de CCR, plusieurs études antérieures avaient montré d'une part que l'expression de FT était associée à l'agressivité du processus tumoral en général, et qu'une inhibition du FT, par différents moyens, ralentissait ce processus et diminuait le nombre de métastases. Mueller et al. ont montré qu'un anticorps anti FT empêchait l'adhésion de cellules de mélanome exprimant le FT, et diminuait le nombre de métastases pulmonaires après injection intraveineuse de ces cellules, dans un modèle de souris immunodéficientes [390]. De plus, le même groupe a démontré que l'injection à des souris immunodéficientes de cellules CHO (chinese hamster ovary), mutées pour surexprimer le gène du FT, entraînait plus de métastases pulmonaires que l'injection de cellules CHO non mutées. L'injection intraveineuse d'une dose de FFR-FVIIa, ainsi que l'incubation des cellules CHO mutées avec le FFR-FVIIa pendant 30 min avant l'injection, provoquait une diminution du nombre de métastases pulmonaires. Ceci démontre que la fixation du FVII au FT est nécessaire pour le développement des métastases [390]. Plus récemment, Hembrough et al. ont montré que 2 autres inhibiteurs du FT, le rNAPc2 et le TFPI empêchaient à la fois le développement de la tumeur primitive après l'injection sous-cutanée de cellules de mélanome (B16) de souris, et des métastases pulmonaires après injection intraveineuse de ces cellules dans un modèle de souris immunodéficientes [341].

A notre connaissance, notre étude est la première à tester l'inhibition du complexe FT-FVIIa dans le CCR, et sur le développement de MH. Ceci est particulièrement intéressant sur le plan clinique dans la mesure où le pronostic des CCR dépend de la survenue de MH plutôt que du développement de la tumeur primitive qui peut le plus souvent être réséquée chirurgicalement. Elle ouvre la perspective de l'utilisation de ce type d'inhibiteur pour empêcher ou freiner la greffe de cellules tumorales dans le parenchyme hépatique, ou la limitation de leur développement.

Les cellules proB ont été obtenues après passage sous-cutané de carcinomes coliques (lignée DHD/K12) chimio-induits par la 1,2-diméthylhydrazine chez le rat BD IX. Leur implantation peut donc se faire dans des rats de même souche, donc dans un modèle syngénique. Ceci est important dans la mesure où le système immunitaire joue un rôle

majeur dans la progression, (ou le ralentissement de la progression) des tumeurs cancéreuses. Nos résultats montrent donc que l'effet inhibiteur du FFR-FVIIa sur le processus de développement des MH est retrouvé même chez des animaux immunocompétents, ce qui renforce leur pertinence clinique. Les cellules proB expriment le FT sans stimulation préalable, et cette expression est insensible à la stimulation par des agents stimulants habituels du promoteur du gène du FT, ce qui suggère que l'expression est constitutive.

Il a été montré que plus de 50% des CCR humains expriment également le FT, et que cette expression est corrélée au potentiel invasif et métastatique de la tumeur [336]. Une première étude complémentaire à nos résultats sera de vérifier *in vitro* la possibilité d'inhiber l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa sur des cellules tumorales humaines isolées, mises en présence de plasma, voire de sang total, ceci afin de vérifier que cet agent inhibiteur est efficace sur les cellules humaines, et d'approcher éventuellement la dose nécessaire à une activité.

Il est très vraisemblable que l'efficacité inhibitrice du FFR-FVIIa sera au moins égale vis-à-vis du FT humain que de celui du rat. L'inhibiteur utilisé est une forme variante du FVIIa recombinant humain, fabriquée par NovoNordisk (inclusion d'un peptide dans le site actif). Le FVIIa recombinant, (NovoSeven®) est une molécule utilisée chez les hémophiles sévères avec inhibiteur, qui permet de court-circuiter les facteurs antihémophiliques. La demi-vie du NovoSeven® après injection intraveineuse est de 2 heures chez l'homme. Des données non publiées qui nous ont été fournies par L Petersen, des laboratoires NovoNordisk, indiquent que, chez le rat, après injection intrapéritonéale, le FFR-FVIIa humain passe dans la circulation après 15 minutes, et que sa demi-vie est également de 2 heures. L'effet inhibiteur du FFR-FVIIa humain est plus faible chez le rat que chez l'homme (60% de l'inhibition du FVIIa humain). Comme nous n'avons réalisé qu'une injection par jour, il est remarquable que nous ayons observé une efficacité malgré l'absence vraisemblable de FFR-FVIIa circulant pendant plus de 20 heures sur le nyctémère.

Lors d'essais préalables à notre étude, nous avons comparé 2 chronologies d'injection du FFR-FVIIa : de J3 à J7 après injection intraportale des cellules proB (traitement que nous avons considéré comme mimant une chimiothérapie adjuvante), et de J7 à J11 (traitement que nous avons considéré comme mimant un traitement palliatif). Chez les 4 rats qui ont reçu un traitement palliatif, les MH se sont développées, ce qui nous a fait opter pour un traitement plus précoce dans l'étude. La posologie utilisée a été la plus élevée avant les complications hémorragiques (données non publiées, de Novo Nordisk). Par contre, nous n'avons pas pour l'instant déterminé la posologie minimale efficace, dans ce modèle. Il faut souligner que la posologie utilisée n'a entraîné aucune manifestation hémorragique.

Le mécanisme par lequel le FFR-FVIIa est efficace sur la prévention du développement des MH dans ce modèle n'est pas complètement éclairci.

Le FT et le complexe FT-FVIIa ont une action proangiogénique, et l'effet antitumoral du FFR-FVIIa pourrait être lié à une inhibition de l'angiogénèse tumorale. Cependant, le FFR-FVIIa n'a pas eu d'effet sur le développement des tumeurs sous-cutanées, ni sur l'angiogénèse de ces tumeurs. De plus nos essais préliminaires avaient également montré qu'en situation palliative (quand les tumeurs sont déjà implantées et vascularisées), le FFR-VIIa n'a eu aucun effet. La fenêtre d'efficacité est brève, à un stade où les tumeurs n'ont pas encore développé leur propre néo-vascularisation. L'hypothèse d'une inhibition de l'angiogénèse tumorale, à proprement parler, par le FFR-VIIa, est donc peu probable.

Il est possible que le FFR-FVIIa agisse par le biais d'une simple action anticoagulante, empêchant l'activation de la cascade protéolytique de la coagulation, et par là même empêchant la formation d'embols de cellules tumorales entourées de fibrine et d'amas plaquettaires, susceptible d'emboliser les petits vaisseaux hépatiques. L'initiation de la cascade de la coagulation a de nombreux liens avec la biologie tumorale. En effet, des travaux anciens ont déjà noté l'affinité de la fibrine pour les cellules tumorales par le biais de certaines intégrines [413]. La fibrine est nécessaire à la formation du stroma tumoral [414]. Enfin, le piégeage des cellules tumorales dans un caillot de fibrine est un mécanisme primordial de la dissémination métastatique [342]. Le FFR-VIIa, en bloquant l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa, s'opposerait ainsi à ce mécanisme. De façon remarquable, l'étude de Hembrough et al., a montré que le TFPI et le rNAPC2 inhibent le processus métastatique et la croissance tumorale. Or ces 2 agents n'inhibent l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa qu'après liaison préalable avec le facteur Xa, donc après génération de facteur Xa. Mais l'utilisation d'un inhibiteur du FXa (le rNAP5), donc un inhibiteur direct de la coagulation, n'a pas d'activité anti-tumorale. Ceci suggère que l'activité protéolytique du complexe FT-FVIIa agit sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique par un mécanisme qui n'est pas uniquement l'inhibition de la cascade de la coagulation [341]. Une hypothèse plus plausible est que le FFR-FVIIa empêche directement l'adhésion, la survie, la migration et la prolifération des cellules cancéreuses, indépendamment de l'activation de la coagulation, en inhibant des voies de signalisation intracellulaire. Ce processus peut être direct, *via* la phosphorylation de la partie intracytoplasmique du FT, ou indirect en activant les récepteurs PARs (Protease-Activated Receptors) [258].

- Effet direct : Des données récentes indiquent que le FT stimule la migration de cellules de carcinomes vésicaux par l'activation de la voie des MAP Kinases p38 et Rac 1 indépendamment de l'activité protéolytique du FVIIa, puisque le FVIIa et le FFR-VIIa sont tous 2 capables d'induire la migration dans ce modèle. Ce mécanisme est dépendant du domaine cytoplasmique du FT [415]. Le FT régule l'adhésion-migration cellulaire par le biais

d'une coopération avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$ [416]. En effet, le FT inhibe la migration cellulaire dépendante des intégrines quand son domaine intra-cellulaire est non phosphorylé. La phosphorylation du domaine supprime cette inhibition, permettant la migration des cellules.

- Effet *via* les récepteurs PAR : Le couple FT-FVIIa est capable de cliver et d'activer les récepteurs PAR, directement pour PAR-2, indirectement *via* la génération de Xa et de IIa pour PAR-1. Ces récepteurs sont couplés à des protéines G qui activent des voies de signalisation intracellulaires.

L'activation des récepteurs PAR-1 a un rôle direct sur la migration et la prolifération tumorale [417]. Le FFR-VIIa, dépourvu d'activité protéolytique, est incapable de générer du facteur Xa et du facteur IIa, donc s'oppose à l'activation des récepteurs PAR-1 par les facteurs Xa et IIa, exerçant ainsi un contrôle négatif sur la migration et la prolifération cellulaire.

Le complexe FT-FVIIa active directement les récepteurs PAR-2, qui activent la voie de signalisation des PKC entraînant la phosphorylation du domaine cytoplasmique du FT [233]. Lorsque le domaine cytoplasmique du FT est non phosphorylé, il exerce une régulation négative sur l'angiogénèse et le bourgeonnement vasculaire. Ce contrôle négatif est inhibé par la phosphorylation du domaine intra-cellulaire du FT (Ser 253 et 258) [218]. Le FFR-VIIa s'oppose à la phosphorylation du domaine intra-cytoplasmique du FT et exerce ainsi un contrôle négatif sur l'angiogénèse, le bourgeonnement vasculaire et la migration cellulaire. Ces effets sont médiés par la voie de signalisation ERK.

L'effet du FFR-VIIa dans notre modèle pourrait donc être dû à une absence d'adhésion et/ou de migration des cellules tumorales au niveau du foie.

Quelque soit le mécanisme sous-jacent, l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa semble une nouvelle cible thérapeutique dans le CCR. Les situations cliniques où ce nouvel outil pourrait avoir sa place restent à définir. Il faut souligner que nos résultats, bien qu'encourageants, ne concernent que l'inhibition du développement des MH de CCR, et non pas le potentiel métastatique propre de la tumeur. En effet, les cellules cancéreuses ont été directement injectées dans la veine porte, et notre modèle ne reproduit pas le processus spontané de migration des cellules cancéreuses à partir d'une tumeur primitive. Cependant, notre modèle analyse la phase la plus importante cliniquement du processus métastatique, à savoir la greffe tumorale dans le foie. Une piste intéressante serait de dénombrer les cellules cancéreuses dans la veine efférente de la tumeur lors de l'exérèse chirurgicale, et leur capacité d'expression du FT pour aider à définir les situations où un tel traitement adjuvant serait le plus utile.

Très récemment, en mars 2007, et alors que nous terminions la présente étude, la FDA (Food and Drug Administration) annonçait que la firme Nuvelo avait obtenu la mise en place d'un essai de phase II pour le rNAPC2 dans le cancer du colon, comme traitement adjuvant.

L'intérêt potentiel du rNAPC2 par rapport au FFR-FVIIa est une plus longue durée de vie (30 heures), plus adaptée à l'utilisation clinique, car permettant de couvrir le nycthémère par une seule injection. Ces essais autorisés concernent 1) le traitement du CCR au stade métastatique (stade IV), en associant le rNAPC2 à l'Avastin® et au 5-FU comme traitement de première ligne, et en évaluant la survie sans progression tumorale, et la survie globale, et 2) l'utilisation du rNAPC2 en association au 5-FU en traitement de seconde ligne.

Ceci fait supposer que des essais ont été réalisés dans le domaine du CCR parallèlement à notre étude, aboutissant à des résultats encourageants, mais pour l'instant non publiés.

Alors que les essais prévus par Nuvelo concernent les stades IV, les données dont nous disposons suggèrent plutôt que l'inhibition du FT-FVIIa serait plus pertinente en traitement adjuvant du CCR au stade III de l'UICC en prévention de l'extension métastatique hépatique. Ceci étant, la posologie, les effets secondaires, le mode et le moment de l'administration doivent être évalués.

Plusieurs questions devront être explorées et résolues avant la mise en place d'applications cliniques. En effet, notre étude a porté sur un inhibiteur très spécifique de l'activité protéolytique du FT-FVIIa, le FFR-FVIIa. Cet agent a plusieurs inconvénients pour une application clinique :

1. Son coût, vraisemblablement très élevé (le coût du FVIIa est d'environ 1 euro l'unité)

2. Sa demi-vie très courte

Ceci posera le problème de ses modalités d'administration.

3. En l'absence de résultats concluants comme antithrombotique en pathologie coronaire, le développement du FFR-FVIIa a été interrompu par NovoNordisk.

Il serait donc logique de tester le rNAPC2 dans notre modèle, en utilisant plusieurs doses et plusieurs schémas d'administration.

Il nous semble important par ailleurs de réaliser 2 études complémentaires chez l'homme, afin de préciser le périmètre d'utilisation :

- 1- L'injection intraveineuse de ce type d'agent aura vraisemblablement pour effet de cibler des cellules tumorales circulantes exprimant le FT. Le FT circulant pourrait donc constituer un marqueur tumoral dans le sang périphérique des patients porteurs d'un CCR, et servir de guide à l'utilisation de médicament inhibiteur. En particulier une quantification du nombre de cellules tumorales exprimant le FT dans la veine mésentérique drainant la tumeur primitive colique pourrait orienter vers une sélection des patients les plus à même de bénéficier de ce type de traitement.

- 2- De plus le FT circulant pourrait être utilisé comme marqueur d'évolutivité tumorale. Actuellement, seul l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) s'est avéré fiable dans la

surveillance des récurrences (locales ou générales) des CCR opérés. Il a été démontré que l'expression de FT était plus élevée dans les tumeurs ayant déjà métastasé, mais aucune étude n'a concerné le FT circulant. Nous souhaiterions réaliser des dosages pré-opératoires de FT dans le sang périphérique de patients porteurs de CCR et le corréler au stade TNM. Le dosage de FT serait réalisé chez tous les patients quelque soit le stade préopératoire (métastatique ou non) et serait comparé au taux d'ACE.

CONCLUSION

L'association thrombose et cancer est connue depuis près de 150 ans mais son exploitation à visée thérapeutique n'est que très récente. L'immunohistochimie a montré que le FT était exprimé par de nombreuses tumeurs solides dont le CCR. Or, dans le CCR, l'expression du FT par la tumeur a été corrélée à l'agressivité tumorale et à la survie. Nous avons montré dans ce travail que le FFR-VIIa s'opposait au développement de MH induites par injection intra-portale de cellules tumorales dans un modèle syngénique, immunocompétent de rat. Le modèle expérimental de MH que nous avons utilisé court-circuite l'histoire naturelle du CCR puisque les cellules tumorales sont directement injectées dans la veine porte, mais semble tout particulièrement adapté à l'étude de l'adhésion tumorale.

Le FFR-FVIIa inhibe l'activité protéolytique du couple FT-FVIIa, donc l'activation de la cascade de la coagulation, et l'activation des récepteurs PAR. Même si le mécanisme anti-tumoral n'est qu'imparfaitement élucidé, le FT apparaît donc comme une cible thérapeutique de choix dans les CCR, en prévention de l'apparition des MH. Ceci ouvre la perspective à des recherches futures, utilisant le FFR-FVIIa, ou d'autres inhibiteurs similaires, tels que le rNAPC2, ou des anticorps monoclonaux. De façon intéressante, une étude de phase II du rNAPC2 a obtenu une autorisation de la *Food and Drug Administration* cette année, dans le CCR au stade IV. La place exacte et les objectifs de traitement de cette nouvelle classe d'agents anticancéreux (traitement adjuvant à la chirurgie ou traitement palliatif de MH existantes) restent à explorer, et ne pourront l'être qu'à travers des collaborations industrielles.

Références bibliographiques

1. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175: 409-416.
2. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris*, 2nd édition, Paris : Baillière 1865.
3. [Prevention, screening and management of colon cancer. Short text of the consensus conference. National Agency of Accreditation and Evaluation of Health (ANAES)]. *Presse Med* 1998; 27: 1283-1289.
4. Cannon-Albright LA, Skolnick MH, Bishop DT et al. Common inheritance of susceptibility to colonic adenomatous polyps and associated colorectal cancers. *N Engl J Med* 1988; 319: 533-537.
5. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2992-3003.
6. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK et al. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 2000; 343: 78-85.
7. Kemp Z, Thirlwell C, Sieber O et al. An update on the genetics of colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 2004; 13 Spec No 2: R177-185.
8. Gryfe R, Swallow C, Bapat B et al. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997; 21: 233-300.
9. Folkman J. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston*. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333: 1757-1763.
10. Jaiswal AS, Balusu R, Narayan S. Involvement of adenomatous polyposis coli in colorectal tumorigenesis. *Front Biosci* 2005; 10: 1118-1134.
11. Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003; 163: 827-832.
12. Lipton L, Halford SE, Johnson V et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 2003; 63: 7595-7599.
13. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1420-1425.
14. Wood CB, Gillis CR, Blumgart LH. A retrospective study of the natural history of patients with liver metastases from colorectal cancer. *Clin Oncol* 1976; 2: 285-288.
15. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of indications for resection. *Registry of Hepatic Metastases. Surgery* 1988; 103: 278-288.
16. Bengmark S, Hafstrom L. The natural history of primary and secondary malignant tumors of the liver. I. The prognosis for patients with hepatic metastases from colonic and rectal carcinoma by laparotomy. *Cancer* 1969; 23: 198-202.
17. McArdle CS, Hole DJ. Outcome following surgery for colorectal cancer. *Br Med Bull* 2002; 64: 119-125.
18. Manfredi S, Lepage C, Hatem C et al. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg* 2006; 244: 254-259.
19. McArdle CS, McKee RF, Finlay IG et al. Improvement in survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005; 92: 1008-1013.
20. Fazio VW, Tjandra JJ. Primary therapy of carcinoma of the large bowel. *World J Surg* 1991; 15: 568-575.
21. Nelson H, Petrelli N, Carlin A et al. Guidelines 2000 for colon and rectal cancer surgery. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 583-596.

22. Salsbury AJ, McKinna JA, Griffiths JD, Morgan CN. Circulating Cancer Cells During Excision of Carinomas of the Rectum and Colon with High Ligation of the Inferior Mesenteric Vein. *Surg Gynecol Obstet* 1965; 120: 1266-1270.
23. Louha M, Nicolet J, Zylberberg H et al. Liver resection and needle liver biopsy cause hematogenous dissemination of liver cells. *Hepatology* 1999; 29: 879-882.
24. Maruthachalam K, Lash GE, Shenton BK, Horgan AF. Tumour cell dissemination following endoscopic stent insertion. *Br J Surg* 2007; 94: 1151-1154.
25. Guadagni F, Kantor J, Aloe S et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res* 2001; 61: 2523-2532.
26. Patel H, Le Marer N, Wharton RQ et al. Clearance of circulating tumor cells after excision of primary colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 235: 226-231.
27. Wharton RQ, Jonas SK, Glover C et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 4158-4163.
28. Yamaguchi K, Takagi Y, Aoki S et al. Significant detection of circulating cancer cells in the blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction during colorectal cancer resection. *Ann Surg* 2000; 232: 58-65.
29. Allen-Mersh TG, McCullough TK, Patel H et al. Role of circulating tumour cells in predicting recurrence after excision of primary colorectal carcinoma. *Br J Surg* 2007; 94: 96-105.
30. Topal B, Aerts JL, Roskams T et al. Cancer cell dissemination during curative surgery for colorectal liver metastases. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31: 506-511.
31. Kan Z, Ivancev K, Lunderquist A et al. In vivo microscopy of hepatic tumors in animal models: a dynamic investigation of blood supply to hepatic metastases. *Radiology* 1993; 187: 621-626.
32. Lasser P, Cote JF, Sabourin JC et al. [Is sentinel lymph node mapping relevant for colon cancer?: a feasibility study]. *Ann Chir* 2003; 128: 433-437.
33. Smith J, Hwang H, Wiseman KW et al. Ex vivo sentinel lymph node mapping in colon cancer: improving the accuracy of pathologic staging? *Am J Surg* 2006; 191: 665-668.
34. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2050-2059.
35. Braga M, Vignali A, Gianotti L et al. Laparoscopic versus open colorectal surgery: a randomized trial on short-term outcome. *Ann Surg* 2002; 236: 759-766; discussion 767.
36. Janson M, Bjorholt I, Carlsson P et al. Randomized clinical trial of the costs of open and laparoscopic surgery for colonic cancer. *Br J Surg* 2004; 91: 409-417.
37. Kaiser AM, Kang JC, Chan LS et al. Laparoscopic-assisted vs. open colectomy for colon cancer: a prospective randomized trial. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2004; 14: 329-334.
38. Lacy AM, Garcia-Valdecasas JC, Delgado S et al. Laparoscopy-assisted colectomy versus open colectomy for treatment of non-metastatic colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2224-2229.
39. Leung KL, Kwok SP, Lam SC et al. Laparoscopic resection of rectosigmoid carcinoma: prospective randomised trial. *Lancet* 2004; 363: 1187-1192.
40. Weeks JC, Nelson H, Gelber S et al. Short-term quality-of-life outcomes following laparoscopic-assisted colectomy vs open colectomy for colon cancer: a randomized trial. *Jama* 2002; 287: 321-328.

41. Martin R, Paty P, Fong Y et al. Simultaneous liver and colorectal resections are safe for synchronous colorectal liver metastasis. *J Am Coll Surg* 2003; 197: 233-241; discussion 241-232.
42. Tanaka K, Shimada H, Matsuo K et al. Outcome after simultaneous colorectal and hepatic resection for colorectal cancer with synchronous metastases. *Surgery* 2004; 136: 650-659.
43. Weber JC, Bachellier P, Oussoultzoglou E, Jaeck D. Simultaneous resection of colorectal primary tumour and synchronous liver metastases. *Br J Surg* 2003; 90: 956-962.
44. Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G et al. Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer: long-term results. In *Ann Surg*, Edition 2000; 487-499.
45. Adam R, Avisar E, Ariche A et al. Five-year survival following hepatic resection after neoadjuvant therapy for nonresectable colorectal. *Ann Surg Oncol* 2001; 8: 347-353.
46. Doci R, Gennari L, Bignami P et al. One hundred patients with hepatic metastases from colorectal cancer treated by resection: analysis of prognostic determinants. *Br J Surg* 1991; 78: 797-801.
47. Rees M, Plant G, Bygrave S. Late results justify resection for multiple hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 1997; 84: 1136-1140.
48. Wagner JS, Adson MA, Van Heerden JA et al. The natural history of hepatic metastases from colorectal cancer. A comparison with resective treatment. *Ann Surg* 1984; 199: 502-508.
49. Saltz LB, Cox JV, Blanke C et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 905-914.
50. Azoulay D, Castaing D, Smail A et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg* 2000; 231: 480-486.
51. Oussoultzoglou E, Bachellier P, Rosso E et al. Right portal vein embolization before right hepatectomy for unilobar colorectal liver metastases reduces the intrahepatic recurrence rate. *Ann Surg* 2006; 244: 71-79.
52. Curley SA, Izzo F, Delrio P et al. Radiofrequency ablation of unresectable primary and metastatic hepatic malignancies: results in 123 patients. *Ann Surg* 1999; 230: 1-8.
53. Navarra G, Ayav A, Weber JC et al. Short- and-long term results of intraoperative radiofrequency ablation of liver metastases. *Int J Colorectal Dis* 2005; 20: 521-528.
54. Brooks AJ, Wang F, Alfredson M et al. Synchronous liver resection and cryotherapy for colorectal metastases: survival analysis. *Surgeon* 2005; 3: 265-268.
55. Weaver ML, Ashton JG, Zemel R. Treatment of colorectal liver metastases by cryotherapy. *Semin Surg Oncol* 1998; 14: 163-170.
56. Kennedy JE, Wu F, ter Haar GR et al. High-intensity focused ultrasound for the treatment of liver tumours. *Ultrasonics* 2004; 42: 931-935.
57. Li CX, Xu GL, Jiang ZY et al. Analysis of clinical effect of high-intensity focused ultrasound on liver cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2201-2204.
58. Pacella CM, Stasi R, Bizzarri G et al. Percutaneous laser ablation of unresectable primary and metastatic adrenocortical carcinoma. *Eur J Radiol* 2007.
59. Simon CJ, Dupuy DE, Iannitti DA et al. Intraoperative triple antenna hepatic microwave ablation. *AJR Am J Roentgenol* 2006; 187: W333-340.
60. Niu R, Yan TD, Zhu JC et al. Recurrence and Survival Outcomes after Hepatic Resection with or without Cryotherapy for Liver Metastases from Colorectal Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2007.
61. Oshowo A, Gillams A, Harrison E et al. Comparison of resection and radiofrequency ablation for treatment of solitary colorectal liver metastases. *Br J Surg* 2003; 90: 1240-1243.

62. Elias D, De Baere T, Smayra T et al. Percutaneous radiofrequency thermoablation as an alternative to surgery for treatment of liver tumour recurrence after hepatectomy. *Br J Surg* 2002; 89: 752-756.
63. Abdalla EK, Vauthey JN, Ellis LM et al. Recurrence and outcomes following hepatic resection, radiofrequency ablation, and combined resection/ablation for colorectal liver metastases. *Ann Surg* 2004; 239: 818-825; discussion 825-817.
64. Adam R, Delvart V, Pascal G et al. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004; 240: 644-657; discussion 657-648.
65. Fong Y, Fortner J, Sun RL et al. Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer: analysis of 1001 consecutive cases. *Ann Surg* 1999; 230: 309-318; discussion 318-321.
66. Adam R, Pascal G, Castaing D et al. Tumor progression while on chemotherapy: a contraindication to liver resection for multiple colorectal metastases? *Ann Surg* 2004; 240: 1052-1061; discussion 1061-1054.
67. Elias D, Liberale G, Vernerey D et al. Hepatic and extrahepatic colorectal metastases: when resectable, their localization does not matter, but their total number has a prognostic effect. *Ann Surg Oncol* 2005; 12: 900-909.
68. Jaeck D. The significance of hepatic pedicle lymph nodes metastases in surgical management of colorectal liver metastases and of other liver malignancies. *Ann Surg Oncol* 2003; 10: 1007-1011.
69. Jaeck D, Nakano H, Bachellier P et al. Significance of hepatic pedicle lymph node involvement in patients with colorectal liver metastases: a prospective study. *Ann Surg Oncol* 2002; 9: 430-438.
70. Elias D, Cavalcanti A, Sabourin JC et al. Results of 136 curative hepatectomies with a safety margin of less than 10 mm for colorectal metastases. *J Surg Oncol* 1998; 69: 88-93.
71. Pawlik TM, Scoggins CR, Zorzi D et al. Effect of surgical margin status on survival and site of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg* 2005; 241: 715-722, discussion 722-714.
72. Fong Y, Sun RL, Jarnagin W, Blumgart LH. An analysis of 412 cases of hepatocellular carcinoma at a Western center. *Ann Surg* 1999; 229: 790-799; discussion 799-800.
73. Hughes KS, Simon R, Songhorabodi S et al. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases: a multi-institutional study of patterns of recurrence. *Surgery* 1986; 100: 278-284.
74. Adam R, Pascal G, Azoulay D et al. Liver resection for colorectal metastases: the third hepatectomy. *Ann Surg* 2003; 238: 871-883; discussion 883-874.
75. Zacharias T, Jaeck D, Oussoultzoglou E et al. First and repeat resection of colorectal liver metastases in elderly patients. *Ann Surg* 2004; 240: 858-865.
76. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545.
77. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420: 860-867.
78. McMillan DC, Canna K, McArdle CS. Systemic inflammatory response predicts survival following curative resection of colorectal cancer. *Br J Surg* 2003; 90: 215-219.
79. McMillan DC, Wotherspoon HA, Fearon KC et al. A prospective study of tumor recurrence and the acute-phase response after apparently curative colorectal cancer surgery. *Am J Surg* 1995; 170: 319-322.
80. Nielsen HJ, Christensen IJ, Sorensen S et al. Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group. *Ann Surg Oncol* 2000; 7: 617-623.

81. Canna K, McMillan DC, McKee RF et al. Evaluation of a cumulative prognostic score based on the systemic inflammatory response in patients undergoing potentially curative surgery for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 1707-1709.
82. Crozier JE, McKee RF, McArdle CS et al. The presence of a systemic inflammatory response predicts poorer survival in patients receiving adjuvant 5-FU chemotherapy following potentially curative resection for colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; 94: 1833-1836.
83. Wong VK, Malik HZ, Hamady ZZ et al. C-reactive protein as a predictor of prognosis following curative resection for colorectal liver metastases. *Br J Cancer* 2007; 96: 222-225.
84. Van Cutsem E, Dicato M, Wils J et al. Adjuvant treatment of colorectal cancer (current expert opinion derived from the Third International Conference: Perspectives in Colorectal Cancer, Dublin, 2001). *Eur J Cancer* 2002; 38: 1429-1436.
85. Arkenau HT, Bermann A, Rettig K et al. 5-Fluorouracil plus leucovorin is an effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: long-term follow-up results of the adjCCA-01 trial. *Ann Oncol* 2003; 14: 395-399.
86. O'Connell MJ, Mailliard JA, Kahn MJ et al. Controlled trial of fluorouracil and low-dose leucovorin given for 6 months as postoperative adjuvant therapy for colon cancer. *J Clin Oncol* 1997; 15: 246-250.
87. de Gramont A, Bosset JF, Milan C et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997; 15: 808-815.
88. Andre T, Tournigand C, Achille E et al. [Adjuvant treatment of colon cancer MOSAIC study's main results]. *Bull Cancer* 2006; 93 Suppl 1: S5-9.
89. Borner MM, Schoffski P, de Wit R et al. Patient preference and pharmacokinetics of oral modulated UFT versus intravenous fluorouracil and leucovorin: a randomised crossover trial in advanced colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2002; 38: 349-358.
90. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *J Clin Oncol* 1997; 15: 110-115.
91. Twelves C, Wong A, Nowacki MP et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2696-2704.
92. Pfeiffer P, Mortensen JP, Bjerregaard B et al. Patient preference for oral or intravenous chemotherapy: a randomised cross-over trial comparing capecitabine and Nordic fluorouracil/leucovorin in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2006; 42: 2738-2743.
93. de Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2938-2947.
94. Giacchetti S, Cuvier C, Hocini H et al. [Neoadjuvant treatment of early breast cancer: new drugs contribution]. *Bull Cancer* 2004; 91 Suppl 4: S232-238.
95. Grothey A, Schmoll HJ. New chemotherapy approaches in colorectal cancer. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 275-286.
96. Tournigand C, Andre T, Achille E et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22: 229-237.
97. Kemeny N, Gonen M, Sullivan D et al. Phase I study of hepatic arterial infusion of floxuridine and dexamethasone with systemic irinotecan for unresectable hepatic metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2687-2695.
98. Kemeny N, Jarnagin W, Paty P et al. Phase I trial of systemic oxaliplatin combination chemotherapy with hepatic arterial infusion in patients with unresectable liver metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4888-4896.

99. Ducreux M, Ychou M, Laplanche A et al. Hepatic arterial oxaliplatin infusion plus intravenous chemotherapy in colorectal cancer with inoperable hepatic metastases: a trial of the gastrointestinal group of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4881-4887.
100. Shimonov M, Hayat H, Chaitchik S et al. Combined systemic chemotherapy and hepatic artery infusion for the treatment of metastatic colorectal cancer confined to the liver. *Chemotherapy* 2005; 51: 111-115.
101. Chung KY, Shia J, Kemeny NE et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1803-1810.
102. Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345.
103. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 2335-2342.
104. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M et al. Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3697-3705.
105. Falcone A, Ricci S, Brunetti I et al. Phase III trial of infusional fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin, and irinotecan (FOLFOXIRI) compared with infusional fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: the Gruppo Oncologico Nord Ovest. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1670-1676.
106. Delpech B. [Cancer stroma]. *Bull Cancer* 1991; 78: 869-900.
107. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 46-54.
108. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 1999; 341: 738-746.
109. Brooks PC, Clark RA, Chersesh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-571.
110. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986; 315: 1650-1659.
111. Ruoslahti E. Specialization of tumour vasculature. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 83-90.
112. Ellis LM, Fidler IJ. Angiogenesis and metastasis. *Eur J Cancer* 1996; 32A: 2451-2460.
113. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 1985; 43: 175-203.
114. Dachs GU, Stratford IJ. The molecular response of mammalian cells to hypoxia and the potential for exploitation in cancer therapy. *Br J Cancer Suppl* 1996; 27: S126-132.
115. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000; 19: 5598-5605.
116. Baba M, Konno H, Maruo Y et al. Relationship of p53 and vascular endothelial growth factor expression of clinicopathological factors in human scirrhous gastric cancer. *Eur Surg Res* 1998; 30: 130-137.
117. Giatromanolaki A, Koukourakis MI, Kakolyris S et al. Vascular endothelial growth factor, wild-type p53, and angiogenesis in early operable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 3017-3024.
118. Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S et al. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 1995; 222: 695-699.
119. Zheng S, Han MY, Xiao ZX et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor expression and neovascularization in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 1227-1230.

120. Holly SP, Larson MK, Parise LV. Multiple roles of integrins in cell motility. *Exp Cell Res* 2000; 261: 69-74.
121. Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M et al. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-1164.
122. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997; 277: 55-60.
123. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 1999; 155: 739-752.
124. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM et al. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 14608-14613.
125. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2000; 156: 361-381.
126. McDonald DM, Foss AJ. Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 109-120.
127. Oh SJ, Jeltsch MM, Birkenhager R et al. VEGF and VEGF-C: specific induction of angiogenesis and lymphangiogenesis in the differentiated avian chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 1997; 188: 96-109.
128. Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7: 462-468.
129. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
130. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003; 9: 685-693.
131. Shi Q, Rafii S, Wu MH et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367.
132. Lyden D, Hattori K, Dias S et al. Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med* 2001; 7: 1194-1201.
133. Scoazec J. [Tumor angiogenesis]. *Ann Pathol* 2000; 20: 25-37.
134. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
135. Mareel MM, Van Roy FM. Are oncogenes involved in invasion and metastasis? *Anticancer Res* 1986; 6: 419-435.
136. Hill RP, Chambers AF, Ling V, Harris JF. Dynamic heterogeneity: rapid generation of metastatic variants in mouse B16 melanoma cells. *Science* 1984; 224: 998-1001.
137. Luria SE, Delbruck M. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* 1943; 28: 491-511.
138. Fidler IJ. Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 1991; 10: 229-243.
139. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979; 63: 1727-1733.
140. Sugarbaker PH. Metastatic inefficiency: the scientific basis for resection of liver metastases from colorectal cancer. *J Surg Oncol Suppl* 1993; 3: 158-160.
141. Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 200-204.
142. Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA, Steeg PS. Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and

- other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res* 1989; 49: 5185-5190.
143. Sarris M, Lee CS. nm23 protein expression in colorectal carcinoma metastasis in regional lymph nodes and the liver. *Eur J Surg Oncol* 2001; 27: 170-174.
144. Ford HL, Kabingu EN, Bump EA et al. Abrogation of the G2 cell cycle checkpoint associated with overexpression of HSIX1: a possible mechanism of breast carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 12608-12613.
145. Li CM, Guo M, Borczuk A et al. Gene expression in Wilms' tumor mimics the earliest committed stage in the metanephric mesenchymal-epithelial transition. *Am J Pathol* 2002; 160: 2181-2190.
146. Yu Y, Khan J, Khanna C et al. Expression profiling identifies the cytoskeletal organizer ezrin and the developmental homeoprotein Six-1 as key metastatic regulators. *Nat Med* 2004; 10: 175-181.
147. Masunaga R, Kohno H, Dhar DK et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4064-4068.
148. Chen WS, Wei SJ, Liu JM et al. Tumor invasiveness and liver metastasis of colon cancer cells correlated with cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and inhibited by a COX-2-selective inhibitor, etodolac. *Int J Cancer* 2001; 91: 894-899.
149. Mareel M, Leroy A. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 2003; 83: 337-376.
150. Kakiuchi Y, Tsuji S, Tsujii M et al. Cyclooxygenase-2 activity altered the cell-surface carbohydrate antigens on colon cancer cells and enhanced liver metastasis. *Cancer Res* 2002; 62: 1567-1572.
151. Bracke ME, Van Roy FM, Mareel MM. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 213 (Pt 1): 123-161.
152. Van Roy F, Mareel M. Tumour invasion: effects of cell adhesion and motility. *Trends Cell Biol* 1992; 2: 163-169.
153. Mbalaviele G, Dunstan CR, Sasaki A et al. E-cadherin expression in human breast cancer cells suppresses the development of osteolytic bone metastases in an experimental metastasis model. *Cancer Res* 1996; 56: 4063-4070.
154. Ochiai A, Akimoto S, Kanai Y et al. c-erbB-2 gene product associates with catenins in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 205: 73-78.
155. Basset P, Bellocq JP, Wolf C et al. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990; 348: 699-704.
156. Neaud V, Faouzi S, Guirouilh J et al. Human hepatic myofibroblasts increase invasiveness of hepatocellular carcinoma cells: evidence for a role of hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1997; 26: 1458-1466.
157. Jouanneau J, Gavrilovic J, Caruelle D et al. Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2893-2897.
158. Guller U, Zajac P, Schnider A et al. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 236: 768-775; discussion 775-766.
159. Weitz J, Koch M, Kienle P et al. Detection of hematogenic tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg* 2000; 232: 66-72.
160. Paku S. Current concepts of tumor-induced angiogenesis. *Pathol Oncol Res* 1998; 4: 62-75.

161. Salazar-Onfray F, Lopez MN, Mendoza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007; 18: 171-182.
162. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991; 65: 13-24.
163. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390: 404-407.
164. Kerbel RS. A cancer therapy resistant to resistance. *Nature* 1997; 390: 335-336.
165. Fidler IJ, Ellis LM. Neoplastic angiogenesis--not all blood vessels are created equal. *N Engl J Med* 2004; 351: 215-216.
166. Streubel B, Chott A, Huber D et al. Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 2004; 351: 250-259.
167. Horstmann E, McCabe MS, Grochow L et al. Risks and benefits of phase 1 oncology trials, 1991 through 2002. *N Engl J Med* 2005; 352: 895-904.
168. Clements MK, Jones CB, Cumming M, Daoud SS. Antiangiogenic potential of camptothecin and topotecan. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 411-416.
169. de Castro G, Jr., Awada A. Side effects of anti-cancer molecular-targeted therapies (not monoclonal antibodies). *Curr Opin Oncol* 2006; 18: 307-315.
170. Hotchkiss KA, Ashton AW, Mahmood R et al. Inhibition of endothelial cell function in vitro and angiogenesis in vivo by docetaxel (Taxotere): association with impaired repositioning of the microtubule organizing center. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 1191-1200.
171. Gasparini G, Longo R, Fanelli M, Teicher BA. Combination of antiangiogenic therapy with other anticancer therapies: results, challenges, and open questions. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1295-1311.
172. Murata K, Moriyama M. Isoleucine, an essential amino acid, prevents liver metastases of colon cancer by antiangiogenesis. *Cancer Res* 2007; 67: 3263-3268.
173. Bissett D, O'Byrne KJ, von Pawel J et al. Phase III study of matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 842-849.
174. Bramhall SR, Schulz J, Nemunaitis J et al. A double-blind placebo-controlled, randomised study comparing gemcitabine and marimastat with gemcitabine and placebo as first line therapy in patients with advanced pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2002; 87: 161-167.
175. Shepherd FA, Giaccone G, Seymour L et al. Prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat after response to first-line chemotherapy in patients with small-cell lung cancer: a trial of the National Cancer Institute of Canada-Clinical Trials Group and the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20: 4434-4439.
176. Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2006; 8: 96-103.
177. Gramoun A, Shorey S, Bashutski JD et al. Effects of Vitaxin(R), a novel therapeutic in trial for metastatic bone tumors, on osteoclast functions in vitro. *J Cell Biochem* 2007.
178. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
179. Thorpe PE, Ran S. Tumor infarction by targeting tissue factor to tumor vasculature. *Cancer J* 2000; 6 Suppl 3: S237-244.
180. Eckhardt SG, Pluda JM. Development of angiogenesis inhibitors for cancer therapy. *Invest New Drugs* 1997; 15: 1-3.
181. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Jama* 2006; 295: 2516-2524.

182. Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329-1338.
183. Kane RC, Farrell AT, Saber H et al. Sorafenib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 7271-7278.
184. Eremina V, Sood M, Haigh J et al. Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest* 2003; 111: 707-716.
185. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int* 2004; 65: 2003-2017.
186. Kamba T, Tam BY, Hashizume H et al. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H560-576.
187. Bates DO, Jones RO. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2003; 2: 107-120.
188. Scappaticci FA, Fehrenbacher L, Cartwright T et al. Surgical wound healing complications in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *J Surg Oncol* 2005; 91: 173-180.
189. Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22: 2184-2191.
190. Sandler A, Gray R, Perry MC et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 2542-2550.
191. Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology* 2005; 69 Suppl 3: 25-33.
192. Hurwitz H, Saini S. Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer: safety profile and management of adverse events. *Semin Oncol* 2006; 33: S26-34.
193. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21: 60-65.
194. Caprioni F, Fornarini G. Bevacizumab in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Future Oncol* 2007; 3: 141-148.
195. Allen JA, Adlakhia A, Bergethon PR. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome after bevacizumab/FOLFIRI regimen for metastatic colon cancer. *Arch Neurol* 2006; 63: 1475-1478.
196. Govindarajan R, Adusumilli J, Baxter DL et al. Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome induced by RAF kinase inhibitor BAY 43-9006. *J Clin Oncol* 2006; 24: e48.
197. Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 125-134.
198. Chow LQ, Eckhardt SG. Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007; 25: 884-896.
199. Kakkar AK, Levine MN. Thrombosis and cancer: implications beyond Trousseau. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 1261-1262.
200. Prandoni P, Lensing AW, Cogo A et al. The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis. *Ann Intern Med* 1996; 125: 1-7.
201. Sorensen HT, Mellekjaer L, Olsen JH, Baron JA. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343: 1846-1850.

202. Sun NC, McAfee WM, Hum GJ, Weiner JM. Hemostatic abnormalities in malignancy, a prospective study of one hundred eight patients. Part I. Coagulation studies. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 10-16.
203. Buccheri G, Ferrigno D, Ginardi C, Zuliani C. Haemostatic abnormalities in lung cancer: prognostic implications. *Eur J Cancer* 1997; 33: 50-55.
204. Seitz R, Rappe N, Kraus M et al. Activation of coagulation and fibrinolysis in patients with lung cancer: relation to tumour stage and prognosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 249-254.
205. Blackwell K, Haroon Z, Broadwater G et al. Plasma D-dimer levels in operable breast cancer patients correlate with clinical stage and axillary lymph node status. *J Clin Oncol* 2000; 18: 600-608.
206. Geenen RW, Delaere KP, van Wersch JW. Coagulation and fibrinolysis activation markers in prostatic carcinoma patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35: 69-72.
207. Edwards CM, Warren J, Armstrong L, Donnelly PK. D-dimer: a useful marker of disease stage in surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 1993; 80: 1404-1405.
208. Gadducci A, Marrai R, Baicchi U et al. The measurement of plasma D-dimer (DD) levels in the follow-up of patients with ovarian cancer. *Anticancer Res* 1995; 15: 2683-2686.
209. van Wersch JW, Peters C, Ubachs HM. Haemostasis activation markers in plasma of patients with benign and malignant gynaecological tumours: a pilot study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 225-229.
210. Beer JH, Haeberli A, Vogt A et al. Coagulation markers predict survival in cancer patients. *Thromb Haemost* 2002; 88: 745-749.
211. von Tempelhoff GF, Dietrich M, Niemann F et al. Blood coagulation and thrombosis in patients with ovarian malignancy. *Thromb Haemost* 1997; 77: 456-461.
212. Browder T, Folkman J, Pirie-Shepherd S. The hemostatic system as a regulator of angiogenesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1521-1524.
213. Trikha M, Nakada MT. Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28: 39-44.
214. Neuenschwander PF, Morrissey JH. Deletion of the membrane anchoring region of tissue factor abolishes autoactivation of factor VII but not cofactor function. Analysis of a mutant with a selective deficiency in activity. *J Biol Chem* 1992; 267: 14477-14482.
215. Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66: 67-79.
216. Bromberg ME, Konigsberg WH, Madison JF et al. Tissue factor promotes melanoma metastasis by a pathway independent of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 8205-8209.
217. Martin DM, Boys CW, Ruf W. Tissue factor: molecular recognition and cofactor function. *Faseb J* 1995; 9: 852-859.
218. Belting M, Dorrell MI, Sandgren S et al. Regulation of angiogenesis by tissue factor cytoplasmic domain signaling. *Nat Med* 2004; 10: 502-509.
219. O'Brien DP. The molecular biology and biochemistry of tissue factor. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2: 801-820.
220. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS. Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 1989; 28: 1755-1762.
221. Forster Y, Meye A, Albrecht S, Schwenzler B. Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 12-21.
222. Cui MZ, Parry GC, Oeth P et al. Transcriptional regulation of the tissue factor gene in human epithelial cells is mediated by Sp1 and EGR-1. *J Biol Chem* 1996; 271: 2731-2739.

223. Mackman N, Brand K, Edgington TS. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 1991; 174: 1517-1526.
224. Mackman N. Regulation of the tissue factor gene. *Faseb J* 1995; 9: 883-889.
225. Ahern SM, Miyata T, Sadler JE. Regulation of human tissue factor expression by mRNA turnover. *J Biol Chem* 1993; 268: 2154-2159.
226. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J et al. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003; 9: 458-462.
227. Chand HS, Ness SA, Kisiel W. Identification of a novel human tissue factor splice variant that is upregulated in tumor cells. *Int J Cancer* 2006; 118: 1713-1720.
228. Tulinsky A. The structures of domains of blood proteins. *Thromb Haemost* 1991; 66: 16-31.
229. Neuenschwander PF, Fiore MM, Morrissey JH. Factor VII autoactivation proceeds via interaction of distinct protease-cofactor and zymogen-cofactor complexes. Implications of a two-dimensional enzyme kinetic mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268: 21489-21492.
230. Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Proteolytic activation of human factors IX and X by recombinant human factor VIIa: effects of calcium, phospholipids, and tissue factor. *Biochemistry* 1990; 29: 9418-9425.
231. Lawson JH, Mann KG. Cooperative activation of human factor IX by the human extrinsic pathway of blood coagulation. *J Biol Chem* 1991; 266: 11317-11327.
232. Roberts HR, Monroe DM, Escobar MA. Current concepts of hemostasis: implications for therapy. *Anesthesiology* 2004; 100: 722-730.
233. Mackman N. Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1015-1022.
234. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134: 1087-1097.
235. Bauer KA, Rosenberg RD. Thrombin generation in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1984; 64: 791-796.
236. Contrino J, Hair GA, Schmeizl MA et al. In situ characterization of antigenic and functional tissue factor expression in human tumors utilizing monoclonal antibodies and recombinant factor VIIa as probes. *Am J Pathol* 1994; 145: 1315-1322.
237. Weiss HJ, Hoffmann T, Turitto VT, Nemerson Y. Further studies on the presence of functional tissue factor activity on the subendothelium of normal human and rabbit arteries. *Thromb Res* 1994; 73: 313-326.
238. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2839-2843.
239. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2311-2315.
240. Nakamura S, Imamura T, Okamoto K. Tissue factor in neutrophils: yes. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 214-217.
241. Todoroki H, Higure A, Okamoto K et al. Possible role of platelet-activating factor in the in vivo expression of tissue factor in neutrophils. *J Surg Res* 1998; 80: 149-155.
242. Osterud B. Tissue factor in neutrophils: no. *J Thromb Haemost* 2004; 2: 218-220.
243. Camera M, Frigerio M, Toschi V et al. Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1690-1696.
244. Muller I, Klocke A, Alex M et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb J* 2003; 17: 476-478.

245. Osterud B, Bjorklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 11-23.
246. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A et al. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13: 247-253.
247. Carlsen E, Flatmark A, Prydz H. Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine. *Transplantation* 1988; 46: 575-580.
248. Herbert JM, Savi P, Laplace MC, Lale A. IL-4 inhibits LPS-, IL-1 beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. *FEBS Lett* 1992; 310: 31-33.
249. Osterud B, Olsen JO, Benjaminsen AW. The role of complement in the induction of thromboplastin synthesis. *Haemostasis* 1984; 14: 386-392.
250. Miserez R, Jungi TW. LPS-induced, but not interferon-gamma-induced procoagulant activity of suspended human macrophages is followed by a refractory state of low procoagulant expression. *Thromb Res* 1992; 65: 733-744.
251. Scheibenbogen C, Moser H, Krause S, Andreesen R. Interferon-gamma-induced expression of tissue factor activity during human monocyte to macrophage maturation. *Haemostasis* 1992; 22: 173-178.
252. Oeth P, Parry GC, Mackman N. Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 365-374.
253. Prydz H, Allison AC. Tissue thromboplastin activity of isolated human monocytes. *Thromb Haemost* 1978; 39: 582-591.
254. Lesnik P, Rouis M, Skarlatos S et al. Uptake of exogenous free cholesterol induces upregulation of tissue factor expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 10370-10374.
255. Lawson CA, Yan SD, Yan SF et al. Monocytes and tissue factor promote thrombosis in a murine model of oxygen deprivation. *J Clin Invest* 1997; 99: 1729-1738.
256. Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR et al. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4533-4537.
257. Archipoff G, Beretz A, Freyssinet JM et al. Heterogeneous regulation of constitutive thrombomodulin or inducible tissue-factor activities on the surface of human saphenous-vein endothelial cells in culture following stimulation by interleukin-1, tumour necrosis factor, thrombin or phorbol ester. *Biochem J* 1991; 273 (Pt 3): 679-684.
258. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407: 258-264.
259. Contrino J, Goralnick S, Qi J et al. Fibrin induction of tissue factor expression in human vascular endothelial cells. *Circulation* 1997; 96: 605-613.
260. Roth RI. Hemoglobin enhances the production of tissue factor by endothelial cells in response to bacterial endotoxin. *Blood* 1994; 83: 2860-2865.
261. Eilertsen KE, Osterud B. Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15: 521-538.
262. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 1997; 89: 2429-2442.
263. Mulder AB, Smit JW, Bom VJ et al. Association of endothelial tissue factor and thrombomodulin with caveolae. *Blood* 1996; 88: 3667-3670.
264. Sevinsky JR, Rao LV, Ruf W. Ligand-induced protease receptor translocation into caveolae: a mechanism for regulating cell surface proteolysis of the tissue factor-dependent coagulation pathway. *J Cell Biol* 1996; 133: 293-304.

265. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 1989; 109: 389-395.
266. Albrecht S, Kotsch M, Siegert G et al. Detection of circulating tissue factor and factor VII in a normal population. *Thromb Haemost* 1996; 75: 772-777.
267. Takahashi H, Satoh N, Wada K et al. Tissue factor in plasma of patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1994; 46: 333-337.
268. Asakura H, Kamikubo Y, Goto A et al. Role of tissue factor in disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 1995; 80: 217-224.
269. Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Kemmotsu O. Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1111-1115.
270. Koyama T, Nishida K, Ohdama S et al. Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994; 87: 343-347.
271. Wada H, Nakase T, Nakaya R et al. Elevated plasma tissue factor antigen level in patients with disseminated intravascular coagulation. *Am J Hematol* 1994; 45: 232-236.
272. Falciani M, Gori AM, Fedi S et al. Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb Haemost* 1998; 79: 495-499.
273. Gori AM, Fedi S, Pepe G et al. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor levels in unstable angina patients during short-term low-molecular-weight heparin administration. *Br J Haematol* 2002; 117: 693-698.
274. Marcucci R, Prisco D, Brunelli T et al. Tissue factor and homocysteine levels in ischemic heart disease are associated with angiographically documented clinical recurrences after coronary angioplasty. *Thromb Haemost* 2000; 83: 826-832.
275. Misumi K, Ogawa H, Yasue H et al. Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81: 22-26.
276. Suefuji H, Ogawa H, Yasue H et al. Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134: 253-259.
277. Sturk-Maquelin KN, Nieuwland R, Romijn FP et al. Pro- and non-coagulant forms of non-cell-bound tissue factor in vivo. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1920-1926.
278. Cuadrado MJ, Dobado-Berrios PM, Lopez-Pedraza C et al. Variability of soluble tissue factor in primary antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 80: 712-713.
279. Tacke F, Schoffski P, Trautwein C et al. Tissue factor and thrombomodulin levels are correlated with stage of cirrhosis in patients with liver disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 539-545.
280. Zumbach M, Hofmann M, Borcea V et al. Tissue factor antigen is elevated in patients with microvascular complications of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1997; 105: 206-212.
281. Polgar J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1590-1596.
282. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res* 2001; 88: 998-1003.
283. Belniak-Legiec E, Stelmasiak Z. [Blood platelet activation markers in patients with acute cerebral infarction during the earliest stage of the disease--evaluation using flow cytometry methods]. *Neurol Neurochir Pol* 2000; 34: 853-864.
284. Lee YJ, Jy W, Horstman LL et al. Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 1993; 72: 295-304.

285. Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood* 1995; 85: 121-129.
286. Kurata M, Okajima K, Kawamoto T et al. Antithrombin reduces reperfusion-induced hepatic metastasis of colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 60-65.
287. Broze GJ, Jr., Girard TJ, Novotny WF. The lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Prog Hemost Thromb* 1991; 10: 243-268.
288. Osterud B, Bajaj MS, Bajaj SP. Sites of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and tissue factor expression under physiologic and pathologic conditions. On behalf of the Subcommittee on Tissue factor Pathway Inhibitor (TFPI) of the Scientific and Standardization Committee of the ISTH. *Thromb Haemost* 1995; 73: 873-875.
289. Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74: 90-93.
290. Kondraganti S, Gondi CS, Gujrati M et al. Restoration of tissue factor pathway inhibitor inhibits invasion and tumor growth in vitro and in vivo in a malignant meningioma cell line. *Int J Oncol* 2006; 29: 25-32.
291. Wojtukiewicz MZ, Sierko E, Zimnoch L et al. Immunohistochemical localization of tissue factor pathway inhibitor-2 in human tumor tissue. *Thromb Haemost* 2003; 90: 140-146.
292. Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 661-667.
293. Carmeliet P, Mackman N, Moons L et al. Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* 1996; 383: 73-75.
294. Bugge TH, Xiao Q, Kombrinck KW et al. Fatal embryonic bleeding events in mice lacking tissue factor, the cell-associated initiator of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6258-6263.
295. Toomey JR, Kratzer KE, Lasky NM et al. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 1996; 88: 1583-1587.
296. Zhang Y, Deng Y, Luther T et al. Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* 1994; 94: 1320-1327.
297. Parry GC, Erlich JH, Carmeliet P et al. Low levels of tissue factor are compatible with development and hemostasis in mice. *J Clin Invest* 1998; 101: 560-569.
298. Parry GC, Mackman N. Mouse embryogenesis requires the tissue factor extracellular domain but not the cytoplasmic domain. *J Clin Invest* 2000; 105: 1547-1554.
299. Zucker S, Mirza H, Conner CE et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75: 780-786.
300. Ollivier V, Bentolila S, Chabbat J et al. Tissue factor-dependent vascular endothelial growth factor production by human fibroblasts in response to activated factor VII. *Blood* 1998; 91: 2698-2703.
301. Shen BQ, Lee DY, Cortopassi KM et al. Vascular endothelial growth factor KDR receptor signaling potentiates tumor necrosis factor-induced tissue factor expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 5281-5286.
302. Corseaux D, Meurice T, Six I et al. Basic fibroblast growth factor increases tissue factor expression in circulating monocytes and in vascular wall. *Circulation* 2000; 101: 2000-2006.
303. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 6934-6938.
304. Camerer E, Pringle S, Skartlien AH et al. Opposite sorting of tissue factor in human umbilical vein endothelial cells and Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Blood* 1996; 88: 1339-1349.

305. Camerer E, Rottingen JA, Iversen JG, Prydz H. Coagulation factors VII and X induce Ca²⁺ oscillations in Madin-Darby canine kidney cells only when proteolytically active. *J Biol Chem* 1996; 271: 29034-29042.
306. Rottingen JA, Enden T, Camerer E et al. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 4650-4660.
307. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med* 1990; 172: 1535-1545.
308. Ott I, Fischer EG, Miyagi Y et al. A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* 1998; 140: 1241-1253.
309. Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB et al. Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 1998; 273: 6228-6232.
310. Major CD, Santulli RJ, Derian CK, Andrade-Gordon P. Extracellular mediators in atherosclerosis and thrombosis: lessons from thrombin receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 931-939.
311. Kahn ML, Zheng YW, Huang W et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* 1998; 394: 690-694.
312. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ et al. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 2000; 404: 609-613.
313. Sorensen BB, Rao LV, Tornehave D et al. Antiapoptotic effect of coagulation factor VIIa. *Blood* 2003; 102: 1708-1715.
314. Jiang X, Guo YL, Bromberg ME. Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells. *Thromb Haemost* 2006; 96: 196-201.
315. Abe K, Shoji M, Chen J et al. Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 8663-8668.
316. Guan M, Jin J, Su B et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human glioma. *Clin Biochem* 2002; 35: 321-325.
317. Hamada K, Kuratsu J, Saitoh Y et al. Expression of tissue factor correlates with grade of malignancy in human glioma. *Cancer* 1996; 77: 1877-1883.
318. Takano S, Tsuboi K, Tomono Y et al. Tissue factor, osteopontin, alphavbeta3 integrin expression in microvasculature of gliomas associated with vascular endothelial growth factor expression. *Br J Cancer* 2000; 82: 1967-1973.
319. Chen Z, Sager R. Differential expression of human tissue factor in normal mammary epithelial cells and in carcinomas. *Mol Med* 1995; 1: 153-160.
320. Contrino J, Hair G, Kreutzer DL, Rickles FR. In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells: correlation with the malignant phenotype of human breast disease. *Nat Med* 1996; 2: 209-215.
321. Luther T, Flossel C, Albrecht S et al. Tissue factor expression in normal and abnormal mammary gland. *Nat Med* 1996; 2: 491-492.
322. Sturm U, Luther T, Albrecht S et al. Immunohistological detection of tissue factor in normal and abnormal human mammary glands using monoclonal antibodies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421: 79-86.
323. Ueno T, Toi M, Koike M et al. Tissue factor expression in breast cancer tissues: its correlation with prognosis and plasma concentration. *Br J Cancer* 2000; 83: 164-170.

324. Vrana JA, Stang MT, Grande JP, Getz MJ. Expression of tissue factor in tumor stroma correlates with progression to invasive human breast cancer: paracrine regulation by carcinoma cell-derived members of the transforming growth factor beta family. *Cancer Res* 1996; 56: 5063-5070.
325. Koomagi R, Volm M. Tissue-factor expression in human non-small-cell lung carcinoma measured by immunohistochemistry: correlation between tissue factor and angiogenesis. *Int J Cancer* 1998; 79: 19-22.
326. Sawada M, Miyake S, Ohdama S et al. Expression of tissue factor in non-small-cell lung cancers and its relationship to metastasis. *Br J Cancer* 1999; 79: 472-477.
327. Shoji M, Hancock WW, Abe K et al. Activation of coagulation and angiogenesis in cancer: immunohistochemical localization in situ of clotting proteins and vascular endothelial growth factor in human cancer. *Am J Pathol* 1998; 152: 399-411.
328. Zacharski LR, Schned AR, Sorenson GD. Occurrence of fibrin and tissue factor antigen in human small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res* 1983; 43: 3963-3968.
329. Abdulkadir SA, Carvalhal GF, Kaleem Z et al. Tissue factor expression and angiogenesis in human prostate carcinoma. *Hum Pathol* 2000; 31: 443-447.
330. Akashi T, Furuya Y, Ohta S, Fuse H. Tissue factor expression and prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2003; 62: 1078-1082.
331. Ohta S, Wada H, Gabazza EC et al. Evaluation of tissue factor antigen level in human seminal plasma. *Urol Res* 2002; 30: 317-320.
332. Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF et al. Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg* 1995; 82: 1101-1104.
333. Nitori N, Ino Y, Nakanishi Y et al. Prognostic significance of tissue factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 2531-2539.
334. Zacharski LR, Memoli VA, Ornstein DL et al. Tumor cell procoagulant and urokinase expression in carcinoma of the ovary. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1225-1230.
335. Poon RT, Lau CP, Ho JW et al. Tissue factor expression correlates with tumor angiogenesis and invasiveness in human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5339-5345.
336. Nakasaki T, Wada H, Shigemori C et al. Expression of tissue factor and vascular endothelial growth factor is associated with angiogenesis in colorectal cancer. *Am J Hematol* 2002; 69: 247-254.
337. Seto S, Onodera H, Kaido T et al. Tissue factor expression in human colorectal carcinoma: correlation with hepatic metastasis and impact on prognosis. *Cancer* 2000; 88: 295-301.
338. Shigemori C, Wada H, Matsumoto K et al. Tissue factor expression and metastatic potential of colorectal cancer. *Thromb Haemost* 1998; 80: 894-898.
339. Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA et al. Indirect activation of blood coagulation in colon cancer. *Thromb Haemost* 1989; 62: 1062-1066.
340. Fernandez PM, Rickles FR. Tissue factor and angiogenesis in cancer. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 401-406.
341. Hembrough TA, Swartz GM, Papathanassiou A et al. Tissue factor/factor VIIa inhibitors block angiogenesis and tumor growth through a nonhemostatic mechanism. *Cancer Res* 2003; 63: 2997-3000.
342. Siegbahn A. Cellular consequences upon factor VIIa binding to tissue factor. *Haemostasis* 2000; 30 Suppl 2: 41-47.
343. Callander NS, Varki N, Rao LV. Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumors. *Cancer* 1992; 70: 1194-1201.

344. Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Rucinska M et al. Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1659-1662.
345. Kageshita T, Funasaka Y, Ichihashi M et al. Tissue factor expression and serum level in patients with melanoma does not correlate with disease progression. *Pigment Cell Res* 2001; 14: 195-200.
346. Mackman N. Gene targeting in hemostasis. tissue factor. *Front Biosci* 2001; 6: D208-215.
347. Staton CA, Chetwood AS, Cameron IC et al. The angiogenic switch occurs at the adenoma stage of the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Gut* 2007.
348. Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G et al. Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumour growth kinetics in advanced colorectal cancer. *Ann Oncol* 1996; 7: 843-848.
349. Hron G, Kollars M, Weber H et al. Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* 2007; 97: 119-123.
350. Yu JL, May L, Lhotak V et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734-1741.
351. Boccaccio C, Sabatino G, Medico E et al. The MET oncogene drives a genetic programme linking cancer to haemostasis. *Nature* 2005; 434: 396-400.
352. Petralia GA, Lemoine NR, Kakkar AK. Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2: 356-363.
353. Bottles KD, Morrissey JH. Dexamethasone enhances agonist induction of tissue factor in monocytes but not in endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1993; 4: 405-414.
354. Muhlfelder TW, Niemetz J, Kang S. Glucocorticoids inhibit the generation of leukocyte procoagulant (tissue factor) activity. *Blood* 1982; 60: 1169-1172.
355. Holschermann H, Terhalle HM, Zakel U et al. Monocyte tissue factor expression is enhanced in women who smoke and use oral contraceptives. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1614-1620.
356. Carlsen E, Gaudernack G, Filion-Myklebust C et al. Allogenic induction of thromboplastin synthesis in monocytes and endothelial cells. Biphasic effect of cyclosporin A. *Clin Exp Immunol* 1989; 76: 428-433.
357. de Prost D, Ollivier V, Hakim J. [Inhibition by pentoxifylline of procoagulant activity produced by endotoxin-active monocytes]. *C R Seances Soc Biol Fil* 1992; 186: 186-192.
358. Conese M, Montemurro P, Fumarulo R et al. Inhibitory effect of retinoids on the generation of procoagulant activity by blood mononuclear phagocytes. *Thromb Haemost* 1991; 66: 662-665.
359. Galvez A, Gomez-Ortiz G, Diaz-Ricart M et al. Desmopressin (DDAVP) enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of cultured human endothelial cells through increased expression of tissue factor. *Thromb Haemost* 1997; 77: 975-980.
360. Osnes LT, Foss KB, Joo GB et al. Acetylsalicylic acid and sodium salicylate inhibit LPS-induced NF-kappa B/c-Rel nuclear translocation, and synthesis of tissue factor (TF) and tumor necrosis factor alfa (TNF-alpha) in human monocytes. *Thromb Haemost* 1996; 76: 970-976.
361. Bierhaus A, Zhang Y, Quehenberger P et al. The dietary pigment curcumin reduces endothelial tissue factor gene expression by inhibiting binding of AP-1 to the DNA and activation of NF-kappa B. *Thromb Haemost* 1997; 77: 772-782.
362. Sun A, Shoji M, Lu YJ et al. Synthesis of EF24-tripeptide chloromethyl ketone: a novel curcumin-related anticancer drug delivery system. *J Med Chem* 2006; 49: 3153-3158.

363. Selvendiran K, Tong L, Vishwanath S et al. EF24 induces G2/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* 2007.
364. Napoleone E, Di Santo A, Camera M et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors downregulate tissue factor synthesis in monocytes. *Circ Res* 2000; 86: 139-143.
365. Corseaux D, Le Tourneau T, Six I et al. Enhanced monocyte tissue factor response after experimental balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbit: inhibition with dietary L-arginine. *Circulation* 1998; 98: 1776-1782.
366. Marx N, Mackman N, Schonbeck U et al. PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes. *Circulation* 2001; 103: 213-219.
367. Neve BP, Corseaux D, Chinetti G et al. PPARalpha agonists inhibit tissue factor expression in human monocytes and macrophages. *Circulation* 2001; 103: 207-212.
368. Colli S, Eligini S, Lalli M et al. Vastatins inhibit tissue factor in cultured human macrophages. A novel mechanism of protection against atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 265-272.
369. Ferro D, Basili S, Alessandri C et al. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000; 149: 111-116.
370. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S et al. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103: 276-283.
371. Eto M, Kozai T, Cosentino F et al. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002; 105: 1756-1759.
372. Camera M, Toschi V, Comparato C et al. Cholesterol-induced thrombogenicity of the vessel wall: inhibitory effect of fluvastatin. *Thromb Haemost* 2002; 87: 748-755.
373. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005; 352: 2184-2192.
374. Presta L, Sims P, Meng YG et al. Generation of a humanized, high affinity anti-tissue factor antibody for use as a novel antithrombotic therapeutic. *Thromb Haemost* 2001; 85: 379-389.
375. Himer J, Refino CJ, Burcklen L et al. Inhibition of arterial thrombosis by a soluble tissue factor mutant and active site-blocked factors IXa and Xa in the guinea pig. *Thromb Haemost* 2001; 85: 475-481.
376. Suleymanov OD, Szalony JA, Salyers AK et al. Pharmacological interruption of acute thrombus formation with minimal hemorrhagic complications by a small molecule tissue factor/factor VIIa inhibitor: comparison to factor Xa and thrombin inhibition in a nonhuman primate thrombosis model. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 1115-1121.
377. Kirchhofer D, Tschopp TB, Baumgartner HR. Active site-blocked factors VIIa and IXa differentially inhibit fibrin formation in a human ex vivo thrombosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15: 1098-1106.
378. Wildgoose P, Berkner KL, Kisiel W. Synthesis, purification, and characterization of an Arg152----Glu site-directed mutant of recombinant human blood clotting factor VII. *Biochemistry* 1990; 29: 3413-3420.
379. Roberge M, Santell L, Dennis MS et al. A novel exosite on coagulation factor VIIa and its molecular interactions with a new class of peptide inhibitors. *Biochemistry* 2001; 40: 9522-9531.
380. Moons AH, Peters RJ, Cate H et al. Recombinant nematode anticoagulant protein c2, a novel inhibitor of tissue factor-factor VIIa activity, abrogates endotoxin-induced coagulation in chimpanzees. *Thromb Haemost* 2002; 88: 627-631.

381. Abraham E, Reinhart K, Svoboda P et al. Assessment of the safety of recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* 2001; 29: 2081-2089.
382. Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A et al. Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following repeated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost* 1998; 80: 506-511.
383. Zoldhelyi P, Chen ZQ, Shelat HS et al. Local gene transfer of tissue factor pathway inhibitor regulates intimal hyperplasia in atherosclerotic arteries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 4078-4083.
384. Zoldhelyi P, McNatt J, Shelat HS et al. Thromboresistance of balloon-injured porcine carotid arteries after local gene transfer of human tissue factor pathway inhibitor. *Circulation* 2000; 101: 289-295.
385. Mouquet F, Didier K, Corseaux D et al. Tissue factor inhibition impairs the maturation of neovascularization in postnatal angiogenesis. In *J Am Coll Cardiol Edition* 2001.
386. Seitz JF, Bennouna J, Paillot B et al. Multicenter non-randomized phase II study of raltitrexed (Tomudex) and oxaliplatin in non-pretreated metastatic colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 2002; 13: 1072-1079.
387. de Gramont A, Tournigand C, Andre T et al. Adjuvant Therapy for Stage II and III Colorectal Cancer. *Semin Oncol* 2007; 34: S37-40.
388. Giuliani F, Colucci G. Cetuximab in colon cancer. *Int J Biol Markers* 2007; 22 Suppl 4: S62-70.
389. Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF et al. Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* 2000; 96: 3302-3309.
390. Mueller BM, Ruf W. Requirement for binding of catalytically active factor VIIa in tissue factor-dependent experimental metastasis. *J Clin Invest* 1998; 101: 1372-1378.
391. Amirkhosravi A, Meyer T, Chang JY et al. Tissue factor pathway inhibitor reduces experimental lung metastasis of B16 melanoma. *Thromb Haemost* 2002; 87: 930-936.
392. Hu Z, Garen A. Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 12180-12185.
393. Panis Y, Nordlinger B. [Experimental models for hepatic metastases from colorectal tumors]. *Ann Chir* 1991; 45: 222-228.
394. Chauffert B, Shimizu T, Caignard A et al. Use of a specific monoclonal antibody for studying the liver metastatic invasion of a rat colon cancer. *In Vivo* 1988; 2: 301-305.
395. Al-Asfoor A, Fedorowicz Z. WITHDRAWN: Resection versus no intervention or other surgical interventions for colorectal cancer liver metastases. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; CD006039.
396. Majer M, Akerley W, Kuwada SK. Oncologists' current opinion on the treatment of colon carcinoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2007; 7: 492-503.
397. Hjortoe GM, Petersen LC, Albrektsen T et al. Tissue factor-factor VIIa-specific up-regulation of IL-8 expression in MDA-MB-231 cells is mediated by PAR-2 and results in increased cell migration. *Blood* 2004; 103: 3029-3037.
398. Chen J, Bierhaus A, Schiekofer S et al. Tissue factor--a receptor involved in the control of cellular properties, including angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86: 334-345.
399. Lwaleed BA, Chisholm M, Francis JL. Urinary tissue factor levels in patients with breast and colorectal cancer. *J Pathol* 1999; 187: 291-294.
400. Lykke J, Nielsen HJ. The role of tissue factor in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 417-422.

401. Yu JL, May L, Klement P et al. Oncogenes as regulators of tissue factor expression in cancer: implications for tumor angiogenesis and anti-cancer therapy. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30: 21-30.
402. Rao LV, Ezban M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11 Suppl 1: S135-143.
403. Sorensen BB, Persson E, Freskgard PO et al. Incorporation of an active site inhibitor in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *J Biol Chem* 1997; 272: 11863-11868.
404. Carson SD. Continuous chromogenic tissue factor assay: comparison to clot-based assays and sensitivity established using pure tissue factor. *Thromb Res* 1987; 47: 379-387.
405. Ghrib F, Leger P, Ezban M et al. Anti-thrombotic and haemorrhagic effects of active site-inhibited factor VIIa in rats. *Br J Haematol* 2001; 112: 506-512.
406. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11832-11836.
407. Ngo CV, Picha K, McCabe F et al. CNTO 859, a humanized anti-tissue factor monoclonal antibody, is a potent inhibitor of breast cancer metastasis and tumor growth in xenograft models. *Int J Cancer* 2007; 120: 1261-1267.
408. Ott I, Weigand B, Michl R et al. Tissue factor cytoplasmic domain stimulates migration by activation of the GTPase Rac1 and the mitogen-activated protein kinase p38. *Circulation* 2005; 111: 349-355.
409. Versteeg HH, Schaffner F, Kerver M et al. Inhibition of tissue factor signaling suppresses tumor growth. *Blood* 2007.
410. Schluter K, Gassmann P, Enns A et al. Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential. *Am J Pathol* 2006; 169: 1064-1073.
411. Belting M, Ahamed J, Ruf W. Signaling of the tissue factor coagulation pathway in angiogenesis and cancer. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 1545-1550.
412. Cirillo P, Cali G, Golino P et al. Tissue factor binding of activated factor VII triggers smooth muscle cell proliferation via extracellular signal-regulated kinase activation. *Circulation* 2004; 109: 2911-2916.
413. Jacquet P, Elias D, Sugarbaker PH. [Tumor implantation in cicatrization sites following surgery for digestive cancers]. *J Chir (Paris)* 1996; 133: 175-182.
414. Dvorak HF, Nagy JA, Berse B et al. Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 667: 101-111.
415. Ott I, Koch W, von Beckerath N et al. Tissue factor promotor polymorphism -603 A/G is associated with myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2004; 177: 189-191.
416. Dorfleutner A, Hintermann E, Tarui T et al. Cross-talk of integrin alpha3beta1 and tissue factor in cell migration. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 4416-4425.
417. Ruf W. Tissue factor-dependent signaling in tumor biology. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33 Suppl 1: 28-30.