

# Les mécanismes de la dissémination métastatique et ses thérapies

par G. Y. Perret

Laboratoire de Pharmacologie, Hôpital Avicenne, AP-HP, Unité CNRS 7033 (BioMoCeTi),  
Équipe d'oncopharmacologie expérimentale, UFR-SMBH, Bobigny

Reçu le 12 octobre 2006

## RÉSUMÉ

Bien que la dissémination métastatique soit la cause la plus fréquente de décès des patients cancéreux, le nombre de médicaments ciblant spécifiquement ce phénomène est actuellement très réduit. Les bases d'une stratégie de découverte de futurs médicaments antimétastatiques sont fragiles en raison du grand nombre d'inconnues caractérisant la connaissance globale des mécanismes de la cascade métastatique. Par ailleurs, les modèles expérimentaux actuels sont trop réducteurs. Un certain nombre de cibles ont été identifiées mais trop peu sont validées. Parmi ces cibles, les gènes suppresseurs de tumeurs sont les plus prometteuses. Malgré tout, une dizaine de molécules ne ciblant que les métastases sans altérer la croissance de la tumeur primaire (éradicable par la chirurgie) ont

été identifiées et évaluées expérimentalement au cours des quinze dernières années, apportant la preuve du concept. La poursuite de cet effort gagnerait en efficacité si les objectifs étaient plus précisément définis. En particulier, il est important de distinguer les molécules destinées à prévenir l'essaimage des métastases à partir de tumeurs primaires en début de progression (action préventive) de celles qui devront faire régresser des métastases établies ou inhiber la transformation de métastases occultes en macrométastases (action curative).

Le deuxième objectif est *a priori* plus pertinent dans les conditions actuelles de détection des tumeurs et devrait faire l'objet d'un plus grand effort de la communauté scientifique.

## SUMMARY Metastatic spread: mechanisms and therapies

Although metastatic spread is the most frequent cause of deaths in cancer patients, there are very few drugs specifically targeting this process. Bases for a new antimetastatic drug discovery strategy are weak because a great number of unknowns characterizes the whole understanding of the metastatic cascade mechanisms. Moreover, the current experimental models are too simplistic and do not account for the complexity of the phenomenon. Some targets have been identified but too few are validated. Among them, metastasis suppressor genes seem to be the most promising. In spite of this, during the last years, a dozen of molecules which fulfill the definition of a specific metastatic drug, namely that inhibit metastases without altering growth of the primary tumor (which

can be eradicated by surgery), have been identified and tried out to assess the proof of the concept. The continuation of this effort would be more efficient if the objectives were defined more precisely. It is particularly important to distinguish molecules aimed at preventing metastatic cell spreading at the primary tumour early stage and molecules which have to induce a regression of established metastases or to inhibit the transition from disseminated occult tumour cells to dormant micrometastasis.

This second goal is *a priori* more relevant in the current clinical setting where detection of the early metastatic spread is very difficult, and therefore it should focus a greater effort of the scientific community.

## DISSÉMINATION MÉTASTATIQUE ET STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES

La majorité des morts par cancer est la conséquence, directe ou indirecte, de la dissémination métastatique (Stegg, 2006). De plus, le pronostic dépend de la localisation métastatique (ganglions > os > poumons >

foie > cerveau). Malgré cela, il n'y a pas, à l'heure actuelle, de thérapeutique inhibant spécifiquement (sans intervenir sur les autres processus de la progression tumorale) la dissémination et l'implantation des métastases. Les seuls médicaments dont nous disposons agissent de manière identique sur la tumeur primaire et ses métastases.

L'approche actuelle consiste à conjuguer des techniques de chirurgie tumorale visant à atténuer la dissémination métastatique immédiate ou retardée avec une chimiothérapie spécifique de la tumeur primaire administrée avant (néoadjuvante) ou après (adjuvante) l'acte chirurgical. Cette pratique est fondée sur la double hypothèse, difficile à vérifier pour chaque patient, d'une équivalence entre tumeur primaire et secondaire en terme de sensibilité à la chimiothérapie, d'une dissémination métastatique précoce et de l'existence de micrométastases occultes non objectivables par les méthodes actuelles d'imagerie.

Malgré tout certains médicaments actuellement utilisés manifestent un tropisme spécifique pour les tissus métastasés en raison de leurs propriétés pharmacocinétiques, les bisphosphonates pour l'os (Steeg, 2006) et certains agents chimiothérapeutiques lipophiles qui peuvent se concentrer dans le foie. Mais il n'y a actuellement aucun médicament agissant spécifiquement sur les métastases pour des raisons pharmacodynamiques.

## BASES D'UNE STRATÉGIE FUTURE

L'objectif général est de réduire l'impact négatif de la dissémination métastatique sur l'état de santé des patients. Pour cela, une approche graduée, en fonction de l'état de la dissémination métastatique chez chaque patient, pourrait être théoriquement envisagée en vue de :

- stabiliser les macrométastases ;
- inhiber le passage micro-/macro-métastases ;
- prévenir la formation de micrométastases.

Un des problèmes majeurs pour imaginer les stratégies conduisant à de nouvelles molécules spécifiquement anti métastatiques est l'absence d'une compréhension mécanistique globale du phénomène de dissémination métastatique. Actuellement nous n'avons accès qu'à une description uniquement phénoménologique : invasion, intravasation, transport sanguin ou lymphatique, extravasation, implantation, progression (Mocellin *et al.*, 2006) qui ne répond pas de manière satisfaisante et prédictive à toute une série de questions :

- quelles cellules métastasent et à quel moment ?
- ce comportement est-il général ou spécifique de chaque type tumoral ?
- les gènes qui déterminent la dissémination métastatique sont-ils différents des gènes induisant la transformation cellulaire ?
- quel est le processus primordial dans l'invasion et l'intravasation ? (transition épithélio-mésenchymateuse ?) (Guo & Giancotti, 2004) ;
- quels sont les facteurs de résistance en jeu au cours du transport sanguin ou lymphatique ? (Chambers *et al.*, 2000 ; Mehlen & Puisieux, 2006 ; Sierra, 2005) ;
- l'extravasation est-elle spécifique de l'organe cible ? (Fidler, 2003) ;
- l'implantation ne fait-elle intervenir que des facteurs locaux ? Ces facteurs se différencient-ils selon le type (ou le grade) tumoral ?

– les modalités de la colonisation sont-elles identiques pour tous les types tumoraux ? (Bogenrieder & Herlyn, 2003) ;

– les facteurs de la progression, cellules occultes, micrométastases, macrométastases, sont-ils identiques à ceux de la progression de la tumeur primitive ? (Steeg, 2006) ;

– quels sont les facteurs moléculaires et cellulaires orientant vers une dissémination par voie sanguine ou lymphatique ? (Pantel & Brakenhoff, 2004) ;

– quel est le degré de prédiction des modèles expérimentaux *in vivo* actuels ?

En quoi les modèles globaux de métastases spontanées (modèles transgéniques, xéno greffes orthotopiques) sont-ils plus utiles pour le screening de nouvelles molécules que les modèles fragmentant le processus (en général, post-intravasation) (modèles de métastases expérimentales : injection intraveineuse ou intracardiaque, implantation dans les organes cibles) (Macdonald *et al.*, 2002) ?

En quoi ces modèles reflètent-ils la réalité clinique actuelle ?

– Actuellement, le diagnostic de la présence d'une tumeur maligne est trop souvent posé tardivement et donc après le début de la dissémination métastatique. Les modèles mimant une dissémination précoce ont donc peu d'intérêt. Ils deviendront pertinents au fur et à mesure que diffuseront dans la pratique clinique des moyens diagnostiques performants de détection des micrométastases.

Quelles cibles sont actuellement validées ? Ces cibles n'interviennent-elles que dans les processus de dissémination ? Quelles sont les cibles spécifiques de la colonisation, qui semble être l'étape actuellement la plus urgente et la plus efficace à contrôler ?

## CIBLES

*A priori*, les cibles moléculaires ou cellulaires les plus pertinentes sont les gènes ou facteurs inhibant la dissémination métastatique sans altérer la croissance de la tumeur primitive et donc interférant spécifiquement avec le processus de colonisation tissulaire (extravasation + implantation et développement). En effet, les travaux de nombreuses équipes, dont celle d'Ann Chambers (Chambers *et al.*, 2000), ont montré que, dans les différents modèles expérimentaux, les deux étapes limitantes étaient, d'une part, le processus d'essaimage à partir de la tumeur primaire (migration, remodelage, intravasation) et, d'autre part, celui de la colonisation des sites métastatiques. Étant donné que la première étape a déjà largement fait son office lors de la découverte d'un cancer chez les patients, c'est la deuxième sur laquelle devrait porter nos efforts.

Dans cette optique, on peut tenter un recensement des biomolécules qui interviennent spécifiquement dans la colonisation. La recherche de molécules spécifiques d'un lit capillaire tumoral à l'aide de phages (*biopanning* par

*phage display in vivo*) a permis de mettre en évidence des facteurs, tels que la métadhérine, qui interfèrent spécifiquement avec l'extravasation. D'autres facteurs ont été impliqués dans l'étape post-extravasation. Des facteurs matricellulaires tissus spécifiques régulent l'implantation métastatique (Mehlen & Puisieux, 2006). Très récemment, on a démontré la constitution d'une pré-niche métastatique par afflux de cellules issues de la moelle osseuse (Kaplan *et al.*, 2005).

Il est maintenant bien établi que les tissus cibles des métastases émettent des signaux solubles (chimiokines) qui vont attirer et recruter les cellules tumorales circulantes possédant les récepteurs complémentaires. Ainsi, le couple CXCL12-CXCR4 favorise la dissémination par voie hématogène et le couple CCL21-CCR7 par voie lymphatique.

À côté de ces facteurs locaux (le « sol » de la théorie de Paget), il existe des facteurs exprimés spécifiquement par les cellules métastatiques (la « graine ») en fonction du lieu d'implantation. Ces facteurs ont été découverts en déterminant l'expression génomique différentielle entre cellules métastatiques originaires d'une même tumeur mais ayant colonisé des organes différents. Par exemple, les métastases hépatiques des cancers colorectaux expriment spécifiquement une tyrosine phosphatase, la PRL3, qui est absente des métastases pulmonaires de cette même tumeur. De même, la tétraspanine D6.1a « dirige » les métastases pancréatiques spécifiquement vers le foie.

Enfin, des études génétiques chez l'animal ou des études *in vitro* de comparaison de signatures géniques ou de transfert de matériel génétique ont démontré l'existence de gènes suppresseurs de métastase inhibant la cascade métastatique sans modifier la croissance de la tumeur primaire (Steeg, 2003). Ainsi, le croisement de souris transgéniques développant spontanément une tumeur primitive métastatisante avec des souris normales ayant un terrain génétique différent a créé des hybrides où croissance de la tumeur primaire et dissémination métastatique sont dissociées. L'analyse génétique des hybrides a mis en évidence des régions chromosomiques (chromosomes 6 et 17 de la souris) susceptibles de porter des gènes suppresseurs de métastases (Yoshida *et al.*, 2000). Le profilage génique différentiel des lignées cellulaires faiblement ou hautement métastatiques de mélanome a permis la découverte du premier gène de ce type (nm23 ou NME1). Mais la plupart ont été découverts par la technique de transfert de chromosomes issus de microcellules provenant de cellules normales dans des cellules isolées hautement métastatiques (Sipa 1, MKK4, BRMS1, RhoGDI2, Kiss1, RKIP, CRSP3, VDUP1). Leurs fonctions physiologiques sont diverses mais leur point commun est d'intervenir dans les voies de signalisation intra- et intercellulaires (Steeg, 2003). Malgré tout le lien entre leurs fonctions physiologiques et leur propriété de suppresseurs de métastases est obscur. Il est intéressant de noter que leur inactivation résulte souvent de mécanismes épigénétiques et est donc *a priori* réversible par l'action de certains médicaments tels que les inhibiteurs des histone-déacétylases (Cui *et al.*, 2006).

## MOLÉCULES AYANT MONTRÉ EXPÉRIMENTALEMENT UNE ACTIVITÉ ANTIMÉTASTATIQUE SANS EFFET SUR LA TUMEUR PRIMAIRE

Depuis plus de vingt ans, certaines équipes se sont focalisées sur la recherche de molécules ayant une activité antimétastatique spécifique. Les approches expérimentales sont diverses et utilisent les différents modèles de métastases. Un point clé est la démonstration de l'absence d'effet sur la tumeur primaire. Les mécanismes d'action invoqués sont très divers. Certaines molécules inhibent l'intravasation probablement en créant une barrière périvasculaire au sein de la tumeur primaire sans altérer sa croissance : razoxane (Hellmann, 1987), complexes de ruthénium (Sava *et al.*, 1998). Mais la plupart agissent sur la colonisation : cicaprost (analogue de la prostacycline) (Schirmer & Schneider, 1992), aryldiméthyltriazenes (dérivés de la dacarbazine) (Sava *et al.*, 1984), peptidomimétiques RGD (S137, S247), anti-intégrines (Shannon *et al.*, 2004), migrastatine (macrolide), inhibiteur de rac (Shan *et al.*, 2005), AMG 487, anti CXCR3 (Walser *et al.*, 2006).

Leur existence apporte la preuve du concept et encourage à poursuivre dans cette voie.

## STRATÉGIES FUTURES

La poursuite de la recherche de nouvelles molécules gagnerait à ce que deux types d'objectifs soient distingués (Chambers *et al.*, 2000).

Tout d'abord, inhiber l'essaimage afin de prévenir l'apparition des métastases. C'est théoriquement, l'idéal. Mais l'objectif d'une prévention précoce est liée à la sensibilité des moyens de détection bioclinique et d'imagerie, qui est actuellement très faible. L'administration de ces médicaments se fera donc à un moment de l'histoire naturelle de la tumeur où l'essaimage a déjà largement commencé. Stopper l'émission de nouvelles cellules métastatiques peut s'avérer inefficace à ce stade. La pertinence clinique actuelle de cette approche est donc faible. Pourtant, force est de constater que la plupart des recherches actuelles ont cet objectif. Beaucoup de molécules actuellement testées en recherche préclinique cherchent à inhiber les mécanismes d'invasion au sein de la tumeur primaire, ce qui a pour conséquence secondaire un moindre essaimage. Les processus et cibles visées sont divers : acquisition d'un phénotype motile (inhibiteurs des voies d'activation de la motilité), intravasation (anti MMPs, inhibiteurs des molécules d'adhésion, etc.).

Les molécules testées expérimentalement (xenogreffes, modèles transgéniques) actuellement sont des :

- inhibiteurs de l'invasion : anti-protéases, anti-intégrines ;
- inhibiteurs de la motilité cellulaire (Eccles, 2005) : inhibiteurs des petites protéines G (bisphosphonates) (Sebbahlouriki *et al.*, 2002) ;
- inhibiteurs du remodelage de la matrice extracellu-

laire : inhibiteurs de la lysesoxidase (induite par l'hypoxie) (Erler *et al.*, 2006) et de l'héparanase (Zhao *et al.*, 2006);  
 – inhibiteurs de la dissémination métastatique par voie lymphatique (anti-VEGFR3) (Achen *et al.*, 2006).

Inhiber ou faire régresser la colonisation constitue le deuxième objectif. *A priori*, cet objectif est plus pertinent que le premier. On peut distinguer deux approches en fonction du moment de l'intervention thérapeutique. Une inhibition précoce de la colonisation se situe théoriquement en aval de l'essaimage mais en amont de la formation de macrométastases. Elle vise donc à inhiber ou faire régresser les cellules occultes ou les micrométastases. L'intérêt clinique de ces molécules ne se manifestera que le jour où ces microfoyers pourront être facilement détectables de manière routinière. *A priori*, les meilleures cibles pour cette approche sont constituées par les gènes suppresseurs de tumeurs ou par les facteurs constitutifs de la niche (ou pré-niche) métastatique.

Une deuxième approche est la régression des métastases établies (macrométastases). Sa pertinence clinique actuelle est considérable et est réaliste au regard des moyens actuels de détection des foyers métastatiques. Les processus qu'il convient de cibler pour cela sont assez bien compris (angiogenèse, interaction hôte-tumeurs). Les modèles expérimentaux à mettre en œuvre sont bien maîtrisés (injection intraveineuse ou intracardiaque, implantation de lignées métastatiques dans l'organe cible).

Les molécules actuellement à l'étude appartiennent à trois classes :

- inhibiteurs de l'adhésion à l'endothélium tumoral :
  - glycoconjugués (Sialyl Lewis X) (Fuster *et al.*, 2003)
  - flavonoïdes (Piantelli *et al.*, 2006)
  - héparinoïdes (Dibenedetto *et al.*, 2003)
- inhibiteurs du pouvoir chimioattractif des métastases : anti-CXCR4 (AMD 3100) (Burger & Kipps, 2006);
- antiangiogéniques (Folkman, 1995).

## CONCLUSION

La recherche thérapeutique anti-métastatique est à l'aube de nouveaux développements majeurs liés à une compréhension globale des mécanismes cellulaires et moléculaires en jeu.

Ces nouvelles thérapeutiques seront probablement :

- moins toxiques;
- spécifiques, en particulier vis-à-vis des sites de colonisation.

Le lourd tribut actuellement payé en terme de mortalité, de morbidité et surtout de qualité de vie en sera considérablement allégé.

## BIBLIOGRAPHIE

Achen M. G., Mann G. B. & Stacker S. A., Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. *Br. J. Cancer*, 2006, 94, 1355-1360.

- Bogenrieder T. & Herlyn M., Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene*, 2003, 22, 6524-6536.
- Burger J. A. & Kipps T. J., CXCR4: a key receptor in the cross-talk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*, 2006, 107, 1761-1767.
- Chambers A. F., MacDonald I. C., Schmidt E. E., Morris V. L. & Groom A. C., Clinical targets for anti-metastasis therapy. *Adv. Cancer Res.*, 2000, 79, 91-121.
- Cui Y. K., Niu A. R., Pestell R., Kumar R., Curran E. M., Liu Y. D. & Fuqua S. A. W., Metastasis-associated protein 2 is a repressor of estrogen receptor  $\alpha$  whose overexpression leads to estrogen-independent growth of human breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.*, 2006, 20, 2020-2035.
- Dibenedetto M., Starzec A., Vassy R., Perret G.Y., Crepin M. & Kraemer M., Inhibition of epidermoid carcinoma A431 cell growth and angiogenesis in nude mice by early and late treatment with a novel dextran derivative. *Br. J. Cancer*, 2003, 88, 1987-1994.
- Eccles S. A., Targeting key steps in metastatic tumour progression. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2005, 15, 77-86.
- Erler J. T., Banneth K. L., Nicolau M., Dornhofer N., Kong C., Le Q. T., Chi J. T., Jeffrey S. S. & Giaccia A.J., Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature*, 2006, 440, 1222-1226.
- Fidler I. J., Timeline – The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Rev. Cancer*, 2003, 3, 453-458.
- Folkman J., Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.*, 1995, 1, 27-31.
- Fuster M. M., Brown J. R., Wang L. C. & Esko J. D., A disaccharide precursor of sialyl Lewis X inhibits metastatic potential of tumor cells. *Cancer Res.*, 2003, 63, 2775-2781.
- Guo W. J. & Giancotti F. G., Integrin signalling during tumour progression. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 2004, 5, 816-826.
- Hellmann K., Razoxane, metastasis and adjuvant chemotherapy. *Clin. Exp. Metastasis*, 1987, 5, 1-2.
- Kaplan R. N., Riba R. D., Zacharoulis S., Bramley A. H., Vincent L., Costa C., MacDonald D. D., Jin D. K., Shido K., Kerns S. A., Zhu Z. P., Hicklin D., Wu Y., Port J. L., Altorki N., Port E. R., Ruggero D., Shmelkov S. V., Jensen K. K., Rafii S. & Lyden D., VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*, 2005, 438, 820-827.
- MacDonald I. C., Groom A. C. & Chambers A. F., Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for *in vivo* models. *Bioessays*, 2002, 24, 885-893.
- Mehlen P. & Puisieux A., Metastasis: a question of life or death. *Nature Rev. Cancer*, 2006, 6, 449-458.
- Mocellin S., Keilholz U., Rossi C. R. & Nitti D., Circulating tumor cells: the “leukemic phase” of solid cancers. *Trends Mol. Med.*, 2006, 12, 130-139.
- Pantel K. & Brakenhoff R. H., Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev. Cancer*, 2004, 4, 448-456.
- Piantelli M., Rossi C., Iezzi M., Lasorda R., Iacobelli S., Alberti S. & Natali P. G., Flavonoids inhibit melanoma lung metastasis by impairing tumor cells endothelium interactions. *J. Cell. Physiol.*, 2006, 207, 23-29.
- Sava G., Giraldo T., Zupi G. & Sacchi A., Effects of antimetastatic dimethyltriazenes in mice bearing Lewis lung carcinoma lines with different metastatic potential. *Invasion Metastasis*, 1984, 4, 171-178.
- Sava G., Capozzi I., Clerici K., Gagliardi R., Alessio E. & Mesroni G., Pharmacological control of lung metastases of solid tumors by a novel ruthenium complex. *Clin. Exp. Metastasis*, 1998, 16, 371-379.
- Schirner M. & Schneider M. R., Cicaprost inhibits metastases of animal tumors. Prostaglandins *Other Lipid Mediat.*, 1992, 42, 451-461.
- Sebbahouriki M., Colombo B. M., Elmanouni D., Martin A., Salz-

- mann J. L., Leroux Y., Perret G. Y. & Crépin M., A new phenylacetate-bisphosphonate inhibits breast cancer cell growth by proapoptotic and antiangiogenic effects. *Anti-cancer Res.*, 2002, 22, 3925-3931.
- Shan D. D., Chen L., Njardarson J. T., Gaul C., Ma X. J., Danishefsky S. J. & Huang X. Y., Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 3772-3776.
- Shannon K. E., Keene J. L., Settle S. L., Duffin T. D., Nickols M.A., Westlin M., Schroeter S., Ruminski P.G. & Griggs D. W., Anti-metastatic properties of RGD-peptidomimetic agents S137 and S247. *Clin. Exp. Metastasis*, 2004, 21, 129-138.
- Sierra A., Metastases and their microenvironments: linking pathogenesis and therapy. *Drug Resist. Updates*, 2005, 8, 247-257.
- Steeg P. S., Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nature Rev. Cancer*, 2003, 3, 55-63.
- Steeg P. S., Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Med.*, 2006, 12, 895-904.
- Walser T. C., Rifat S., Ma X. R., Kundu N., Ward C., Goloubeva O., Johnson M. G., Medina J. C., Collins T. L. & Fulton A. M., Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res.*, 2006, 66, 7701-7707.
- Yoshida B. A., Sokoloff M. M., Welch D. R. & Rinkerschaefter C. W., Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J. Nat. Cancer Inst.*, 2000, 92, 1717-1730.
- Zhao H. J., Liu H. Y., Chen Y., Xin X. L., Li J., Hou Y. T., Zhang Z. H., Zhang X. W., Me C. Y., Geng M. Y. & Ding J., Oligomannuric acid sulfate, a novel heparanase inhibitor simultaneously targeting basic fibroblast growth factor, combats tumor angiogenesis and metastasis. *Cancer Res.*, 2006, 66, 8779-8787.
-