

Université de Montréal

Mise au point d'une méthode de culture tissulaire pour  
l'évaluation de l'effet antiangiogène de quelques substances

Par Esmā Lejmi

Faculté de pharmacie

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en vue de  
l'obtention du grade de maître en sciences pharmaceutiques (MSc)  
option technologie pharmaceutique

Février 2005-01-31

©Esmā Lejmi , 2005



①V

405

U58

2005

v.011

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
**Mise au point d'une méthode de culture tissulaire pour  
l'évaluation de l'effet antiangiogène de quelques  
substances**

Présenté par :  
Esma Lejmi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Pierre Moreau, président rapporteur  
Dr. Patrice Hildgen, directeur de recherche  
Dr. Fahima Nekka, membre du jury

## Résumé

L'angiogenèse est le processus par lequel on assiste à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un lit vasculaire pré-existant. Elle est retrouvée dans diverses situations physiologiques et pathologiques notamment au cours du développement tumoral, d'où le grand intérêt porté par les scientifiques à son égard.

Dans ce travail, on a opté pour l'essai sur aorte de rat pour étudier certains aspects de l'angiogenèse et tester certaines molécules anti-angiogéniques à savoir : le 2 méthoxy-oestradiol, le paclitaxel et l'acide rétinoïque libre et encapsulé. Ce qui nous a permis d'obtenir les résultats suivants :

- la croissance vasculaire en fonction du temps suit une courbe avec une croissance rapide au début et un plateau au-delà de la 3<sup>ème</sup> semaine,
- l'erreur relative due à l'expérimentateur varie de 1 à 3%.
- le 2 méthoxy-oestradiol permet une inhibition de 95% pour une concentration de  $2.10^{-6}$ mol/L et de 100% pour une concentration de  $4.10^{-6}$ mol/L.
- le paclitaxel a entraîné, une inhibition concentration dépendante de la néoangiogénèse atteignant les 96 % :
- l'acide rétinoïque montre un effet antiangiogénique de l'ordre de 62% pour une concentration de  $10^{-6}$ mol/L sans différence notable lors de l'utilisation de concentrations plus importantes.
- les nanosphères donnent une meilleure inhibition que l'acide rétinoïque libre dans la mesure où elles sont accompagnées d'une dose de charge.

Mots clés : Angiogenèse, test sur aorte de rat, anti-angiogenèse, 2-méthoxy-oestradiol, paclitaxel, acide rétinoïque.



## Summary

Angiogenesis, the process through which new blood vessels develop from pre-existing vessels, is an integral part of both normal developmental processes and numerous pathologies (inflammation, ocular diseases, tumor growth and metastasis). The understanding that the growth of tumor depends on the acquisition of a proportional blood supply has led to an extensive interest in studying angiogenesis and antiangiogenesis.

In this work the rat aortic ring assay was used to study different aspects of angiogenesis and test three antiangiogenic substances : 2 Methoxy-estradiol, Paclitaxel and Retinoic acid (free and encapsulated).

The results show that :

- the vascular growth was rapid during the first two weeks and become constant from the third week
- the relative error due to the manipulator was from one to three percent
- the inhibition of vascular growth was of 95 % for  $2.10^{-6}$ mol/L of 2 Methoxy-estradiol and 100% for a concentration of  $4.10^{-6}$ mol/L
- the inhibition of vascular growth by Paclitaxel was dose dependent
- with free Retinoic acid about 62% of inhibition was observed and there were no differences with higher doses. Whereas encapsulated, Retinoic Acid shows better percentage of inhibition especially if it's supplemented with a loading dose.

Key word : Angiogenesis, rat aortic ring assay, antiangiogenesis, 2 Methoxy-estradiol, Paclitaxel, Retinoic acid.

<b>1 INTRODUCTION :</b>	<b>2</b>
1.1 ANGIOGENÈSE : PHÉNOMÈNE BIOLOGIQUE :	4
1.1.1 <i>Rappel histologique :</i>	5
1.1.2 <i>L'angiogenèse proprement dite :</i>	6
1.1.3 <i>Les médiateurs de l'angiogenèse :</i>	8
1.1.3.1 Médiateurs positifs :	8
1.1.3.1.1 VEGF :	8
1.1.3.1.2 b-FGF :	10
1.1.3.1.3 Angiopoïétines 1 et 2 :	10
1.1.3.1.4 HIF $\alpha$ (Hypoxy Inducing Factor) :	10
1.1.3.1.5 L'héparine :	11
1.1.3.2 Inhibiteurs de l'angiogenèse :	11
1.1.3.2.1 L'angiostatine :	12
1.1.3.2.2 L'endostatine :	12
1.1.3.2.3 Les autres facteurs anti- angiogéniques naturels :	12
1.2 ANGIOGENÈSE PATHOLOGIQUE :	13
1.2.1 <i>Angiogenèse et tumeur :</i>	13
1.2.2 <i>Autres pathologies :</i>	18
1.3 LES MÉTHODES D'ÉTUDES :	18
1.3.1 <i>Les tests in vitro :</i>	18
1.3.1.1 Les tests sur cultures cellulaires :	18
1.3.1.1.1 Test de prolifération cellulaire :	19
1.3.1.1.2 Test de migration cellulaire :	19
1.3.1.1.3 La formation tubulaire (Fig n°6) :	21
1.3.1.2 Les tests sur cultures d'organes :	23
1.3.1.2.1 Test sur anneau d'aorte de rat :	23
1.3.1.2.2 Test sur aorte de poulet :	24
1.3.2 <i>Les tests in vivo :</i>	25

1.3.2.1	Test sur embryon de poulet : .....	25
1.3.2.2	Test sur cornée : .....	28
1.3.2.3	Test sur bouchon de matrigel : .....	29
1.4	LES MÉTHODES D'INHIBITION : .....	30
1.4.1	<i>Les différents mécanismes d'action</i> : .....	32
1.4.1.1	Agents inhibiteurs des cellules endothéliales : .....	32
1.4.1.2	Agents inhibiteurs des facteurs de croissance endothéliaux : .....	34
1.4.1.2.1	L'utilisation d'anticorps monoclonaux : .....	34
1.4.1.2.2	L'inhibition du VEGF-R tyrosine kinase : .....	35
1.4.1.2.3	L'inhibition du VEGF-R par les ribosymes ciblés : .....	36
1.4.1.3	Agents inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles MMP : .....	37
1.4.1.4	Agents inhibiteurs avec un mécanisme d'action mal connu : .....	38
1.4.1.5	Nouvelles approches interférant avec le débit sanguin tumoral : .....	39
1.4.1.5.1	Les stratégies visant à induire la coagulation sanguine intra-tumorale : .....	39
1.4.1.5.2	Les stratégies ciblant les cellules endothéliales tumorales : .....	40
1.4.1.5.3	Quête de nouvelles cibles au niveau de l'endothélium tumoral : .....	41
1.4.2	<i>Mécanismes potentiels d'acquisition aux drogues anti-angiogéniques</i> : .....	42
1.4.2.1	Le projet : .....	43
1.4.3	<i>Hypothèse</i> : .....	43
1.4.4	<i>Objectif</i> : .....	44
1.4.5	<i>Méthode choisie</i> : .....	44
<b>2</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> : .....	<b>46</b>
2.1	MATÉRIELS ET PRODUITS UTILISÉS : .....	46
2.2	MÉTHODES : .....	47
2.2.1	<i>Préparation du collagène</i> : .....	48
2.2.1.1	Recueil des queues : .....	48
2.2.1.2	Dissection et solubilisation des tendons : .....	48
2.2.1.3	Dosage du collagène : .....	49
2.2.2	<i>Préparation des puits</i> : .....	49
2.2.3	<i>Prélèvement du tissu</i> : .....	50

2.2.4	<i>Préparation des anneaux</i> : .....	50
2.2.5	<i>Mise en culture</i> : .....	51
2.2.6	<i>Produits antiangiogéniques à tester</i> : .....	51
2.2.6.1	Le 2 méthoxy-oestradiol (2ME) : .....	51
2.2.6.2	Le paclitaxel : .....	52
2.2.6.3	L'acide rétinoïque : .....	53
2.2.7	<i>Acquisition et analyse des images</i> : .....	54
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b> : .....	<b>56</b>
3.1	CULTURE TÉMOIN : .....	56
3.1.1	<i>Première culture</i> : .....	56
3.1.2	<i>Deuxième culture</i> : .....	60
3.1.3	<i>Conclusion</i> : .....	62
3.2	APPRÉCIATION DE L'ERREUR DUE À L'EXPÉRIMENTATEUR : .....	63
3.3	CULTURE EN PRÉSENCE DU 2 MÉTHOXY-OESTRADIOL : .....	65
3.4	CULTURE EN PRÉSENCE DU PACLITAXEL : .....	67
3.4.1	<i>Culture à J7</i> : .....	67
3.4.2	<i>Culture à J15</i> : .....	70
3.5	CULTURE EN PRÉSENCE D'ACIDE RÉTINOÏQUE LIBRE ET ENCAPSULÉ : .....	72
3.5.1	<i>Acide rétinoïque libre</i> : .....	72
3.5.1.1	<i>Culture à J7</i> : .....	72
3.5.1.2	<i>Culture à J15</i> : .....	75
3.5.2	<i>Acide rétinoïque encapsulé</i> : .....	78
3.5.2.1	<i>Première culture à J7</i> : .....	78
3.5.2.2	<i>Deuxième culture à J7</i> : .....	80
3.5.2.3	<i>Deuxième culture à J15</i> : .....	82
<b>4</b>	<b>CONCLUSION</b> : .....	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>89</b>

### Liste des figures

Figure 1 : Schémas d'un vaisseau sanguin.....	5
Figure 2 : Début de la migration des cellules endothéliales.....	6
Figure 3 : Angiogenèse proprement dite.....	7
Figure 4 : Formation de vaisseaux sanguins chez l'embryon et angiogenèse tumorale [26] .....	15
Figure 5 : test de migration cellulaire (traçage phagocinétique ) [28, 34] .....	21
Figure 6 : Formation tubulaire à partir des cellules endothéliales de myocarde murin dans du matrigel 24h après la mise en culture [37] .....	22
Figure 7 : croissance vasculaire à partir d'anneau d'aorte de rat [28]. .....	23
Figure 8 : test sur membrane chorio-allantoïque [42] .....	26
Figure 9 : effet du bFGF placé sous le couvercle de la boîte de pétri (photo de gauche à 0h, photo de droite à 72h) [41] .....	27
Figure 10 : angiogenèse induite par bFGF dans la cornée de souris [47] .....	29
Figure 11 : Formule d'une molécule du 2 méthoxy-oestradiol.....	51
Figure 12 : Formule d'une molécule de paclitaxel.....	52
Figure 13 : Formules des molécules d'acide rétinoïque tout trans et 9-cis.....	53
Figure 14 : Les différentes étapes de traitement des photos.....	55

Figure 15 : Photos d'anneau en culture : A à J7, B à J11, C à J15.....	56
Figure 16 : Courbe représentant la croissance vasculaire en fonction du temps.....	58
Figure 17 : Courbe représentant la croissance vasculaire en fonction du temps.....	61
Figure 18 : Photos d'un réseau vasculaire D à J5 et E à J20.....	63
Figure 19 : Photos des différentes cultures en présence du 2 ME à J21 .....	65
Figure 20 : Photos des différentes cultures en présence du paclitaxel à J7.....	68
Figure 21 : Photos des différentes cultures en présence du Paclitaxel à J15.....	70
Figure 22 : Photos des différentes cultures en présence d'AR libre à J7 .....	73
Figure 23 : Photos des différentes cultures en présence d'AR libre à J15 .....	75
Figure 24 : Photos des différentes cultures en présence d'AR encapsulé à J7.....	78
Figure 25 : Photos des différentes cultures en présence d'AR encapsulé à J7.....	80
Figure 26 : Photos des différentes cultures en présence d'AR encapsulé à J15.....	82
Figure 27 : Angiogenèse tumorale .....	85

**Liste des tableaux**

Tableau I : Densité vasculaire en fonction du temps.....	57
Tableau II : Densité vasculaire en fonction du temps .....	60
Tableau III : Densité de la vascularisation en fonction du moment d'analyse.....	64
Tableau IV : Densité vasculaire des cultures en présence du 2ME.....	66
Tableau V : Densité vasculaire des cultures en présence paclitaxel à J7.....	69
Tableau VI : Densité vasculaire des cultures en présence du paclitaxel à J15.....	71
Tableau VII : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR libre à J7.....	74
Tableau VIII : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR libre à J15 .....	76
Tableau IX : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J7.....	79
Tableau X : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J7.....	81
Tableau XI : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J15.....	83

## Liste des abréviations

- 2ME : 2 méthoxy oestradiol
- RAR : Récepteur de l'acide rétinoïque
- AR : Acide rétinoïque
- ARNm : Acide Ribonucléique messenger
- BCA : Acide Biscinchronic
- BSA : Serum Albumine Bovin
- CAM : Membrane Chorio-Allantoïque
- cm<sup>3</sup> : centimètre cube
- CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CML : Cellules Musculaires Lisses
- COX-2 : Cyclo-oxygénase 2
- FGF : Fibroblast Growth Factor ou Facteur de croissance des fibroblastes
- HIF : Hypoxy Inducible Factor ou facteur induit par l'hypoxie
- IL-1 : Interleukine 1
- IL-6 : Interleukine 6
- MMP : Matrice métallo protéinase
- mm<sup>3</sup> : millimètre cube
- NO : Monoxyde d'azote
- O<sub>2</sub> : Oxygène
- PDGF : Produit de dégradation des facteurs de croissance
- PGE<sub>2</sub> : Prostaglandine E<sub>2</sub>
- TGF : Tumor Growth Factor ou Facteur de croissance tumorale
- TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha ou facteur de nécrose tumorale alpha
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor ou facteur de croissance endothéliale vasculaire
- VEGFR : Récepteur du VEGF

*Je dédie ce travail...*

*A mon très cher mari Bazzy,*

Pour toute ta patience, ta compréhension, ta présence, ton soutien, ton amour... Sans toi, je n'aurais jamais eu la force de finir ce travail. Je te le dédie en témoignage de ma profonde reconnaissance et mon grand amour. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi, merci chéri.

J'espère que tu seras toujours à mes côtés pour donner un sens à tout ce que je fais et me faire oublier tous mes soucis.

Que Dieu veille sur toi, exhausse tes prières, protège notre amour et nous aide à dépasser les moments difficiles de notre vie.

Je t'aime plus que tout.

*A mes parents Nour El Houda et Mohamed,*

Pour m'avoir toujours soutenu et cru en moi, même quand moi-même j'avais du mal à le faire. Aucun mot ne saurait exprimer la profondeur de l'amour que j'éprouve pour vous.

Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait et que vous faites encore pour moi et je vous dédie ce mémoire pour vous dire que je vous aime énormément.

Que Dieu vous protège.

*A ma petite sœur Soussou,*

Pour tout ce que nous avons partagé et tout nos souvenirs ensemble : nos querelles et nos réconciliations ; nos pleurs et nos joies ; je t'aime beaucoup saghrounti.

Puisse Dieu t'offrir santé, succès et tout le bonheur du monde

*A mes beaux parents : Noura et Tawfik,*

Pour votre amour et soutien et tous les efforts que vous n'avez pas épargnés pour nous aider, je vous en suis très reconnaissante. Que Dieu te guérisse et vous donne paix et santé.

*A mes belles sœurs Rim et ses enfants Lina et Alaa, Dhouha et son mari Haythem et Halloula,*

En témoignage de mon affection. Je vous souhaite bonheur, paix, santé et succès.

*A Lucie, Mahrez, Mariam, Lilia et Salim REKIK,*

Jamais je n'oublierai tout ce que vous avez fait pour moi, vous étiez une famille pour moi, je vous serai éternellement reconnaissante. Merci pour tout.

*A Mamma, Omi Cherifa, Tata et Khali,*

*A l'âme de mes grands-pères et mon oncle,*

*A toute ma famille Lejmi, Bouaziz et Chatti*

*A Leila*

Pour tous les moments qu'on a partagé en lui souhaitant bonheur et santé

*A Imène*

En souvenir de nos années de Grombalia, je te souhaite beaucoup de bonheur et de succès

*A tous mes amis*

*A tous ceux qui m'aiment....*

Je tiens à remercier tout particulièrement

*Mon directeur de recherche Patrice HILDGEN,*

Je tiens à vous remercier tout particulièrement pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre encadrement, veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de ma reconnaissance et mon estime.

*Daphné GIRARDOT,*

Pour m'avoir appris la technique de culture et m'avoir aidé tout le long de mon travail.

*Le professeur Pierre MOREAU,*

*Tous mes collègues de travail,*

*Tout le personnel du laboratoire du professeur Pierre MOREAU,*

*La mission universitaire de Tunisie.*



## 1 Introduction :

L'angiogenèse constitue le processus par lequel on assiste au développement de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un lit vasculaire préexistant. A l'état normal, la vascularisation, en dehors de certaines situations physiologiques telles que la cicatrisation, le cycle menstruel et l'embryogenèse, demeure à l'état quiescent.

L'angiogenèse retrouvée chez l'adulte est donc souvent pathologique, elle apparaît au cours des maladies chroniques comme le diabète, les rétinopathies, le psoriasis et surtout au niveau des tumeurs. Les changements génétiques, les facteurs de stress local incluant l'hypoxie, la déprivation glucosique ainsi que le stress oxydatif sont à l'origine du déclenchement de l'angiogenèse qui est nécessaire pour le développement tumoral.

L'étude de l'angiogenèse au cours de la croissance des tumeurs constitue un secteur de recherche en pleine effervescence. Cet intérêt provient de résultats importants, tant au niveau fondamental que clinique, montrant que la progression tumorale est très étroitement liée au degré de néovascularisation intratumorale. L'inhibition de cette néovascularisation par des composés perturbant certaines étapes moléculaires et cellulaires associées au développement des nouveaux vaisseaux est actuellement à l'étude dans plusieurs essais cliniques, et pourrait permettre le développement de traitements contrôlant la progression de métastases. C'est ainsi qu'ont été développés des essais précliniques de substances anti-angiogéniques, artificielles ou naturelles, et agissant à plusieurs niveaux : l'inhibition de l'action des facteurs angiogéniques sur leurs récepteurs, l'inhibition du signal angiogénique intracellulaire et l'altération de l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire.

L'inhibition thérapeutique de l'angiogenèse a été proposée pour la première fois en 1971 par Judah Folkman [1]. Plusieurs études ont démontré que la croissance, l'invasion tissulaire et la métastatisation des cancers dépendent toutes de la capacité des cellules tumorales à développer un réseau vasculaire. Une tumeur peut en fait atteindre une taille de  $1 \text{ mm}^3$  sans atteinte ischémique majeure [2]. Le développement d'un cancer suit plusieurs étapes distinctes : la cellule tumorale accumule au cours du temps plusieurs mutations génétiques qui lui permettent d'échapper à l'apoptose et de se répliquer anarchiquement [3]. L'hypoxie est impliquée dans la sélection des cellules tumorales suivant trois mécanismes : (1) la présence de mutation de p53, (2) de cassures chromosomiques aux sites fragiles et (3) de la transcription de VEGF [4]. L'équilibre entre les facteurs angiogéniques et anti-angiogéniques est perturbé en faveur de l'angiogenèse [5] chez le patient cancéreux.

Cette approche pour le traitement du cancer présente plusieurs avantages par rapport aux traitements conventionnels qui agissent contre la cellule tumorale, à savoir [6] :

- Un agent toxique pour les cellules endothéliales arrive facilement à sa cible par administration systémique. En revanche, un agent dirigé contre une tumeur doit d'abord diffuser de longues distances et vaincre la pression interstitielle élevée typique des tumeurs solides [7].
- Les cellules endothéliales activées expriment des intégrines spécifiques qui peuvent être utilisés comme marqueurs angiogéniques [7] et pourraient servir de site de ciblage thérapeutique.
- La cellule endothéliale est un type cellulaire non-malin, avec un génotype stable. Il est peu probable qu'elle acquière une résistance médicamenteuse par mutation ou évolution clonale [8].
- L'inhibition de l'angiogenèse ne demande pas une destruction totale des vaisseaux. Une discontinuité dans l'alignement endothélial provoque la formation d'un thrombus occlusif, qui bloque le flux sanguin vers la tumeur.

Il a été estimé qu'une cellule endothéliale détruite induit la mort cellulaire d'environ 100 cellules tumorales [7].

- L'angiogenèse est un processus dont l'inhibition ne semble pas avoir d'effets secondaires trop dévastateurs chez les patients adultes [8].

Le processus angiogénique est étroitement contrôlé par un nombre important de facteurs proangiogéniques et antiangiogéniques.

Plusieurs modèles *in vivo* et *in vitro* ont été développés dans le but de tester les agonistes et antagonistes angiogéniques et d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'angiogenèse.

L'essai sur aorte de rat, développé initialement par Nicosia et Ottinetti [9] constitue un pont entre les modèles *in vivo* et ceux *in vitro*. Dans ce système, les anneaux d'aorte de rat cultivés dans une matrice de collagène donnent lieu à un réseau vasculaire bien développé. L'utilisation d'implant vasculaire intact permet une reproduction plus exacte du microenvironnement dans lequel se produit l'angiogenèse que lorsqu'il s'agit d'étude faite sur des cellules endothéliales isolées. C'est pourquoi on a choisi ce modèle pour étudier l'angiogenèse et tester des produits anti-angiogéniques suivants :

- le 2 méthoxy-œstradiol testé en tant que produit référence pour vérifier que la méthode permet l'étude des produits anti-angiogéniques
- le paclitaxel
- et l'acide rétinoïque libre et encapsulé.

### **1.1 Angiogenèse : phénomène biologique :**

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux capillaires sanguins sont produits par *sprouting* à partir de vaisseaux pré-existants, de précurseurs endothéliaux pendant la vie embryonnaire et postnatale [10, 11].

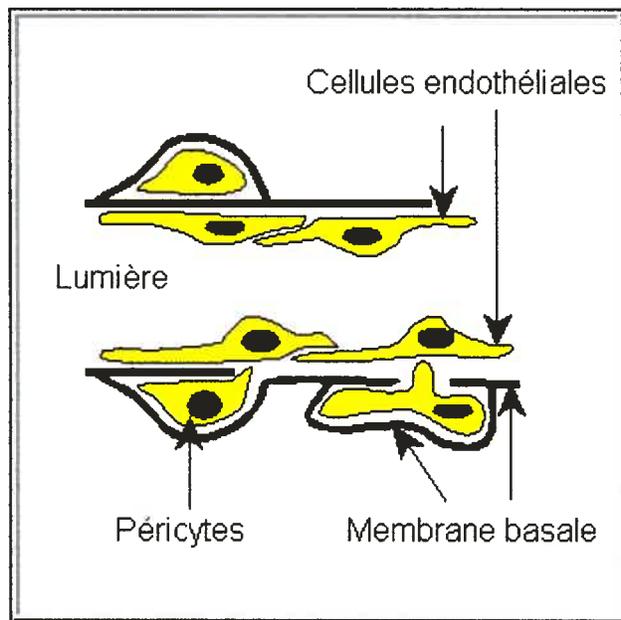
À l'inverse, la vasculogenèse est la formation de vaisseaux sanguins dans le mésoderme embryonnaire à partir de précurseurs non-endothéliaux ; elle est

très étudiée dans le sac vitellin du poulet. En effet, les cellules mésenchymateuses (hémangioblastes) forment des îlots sanguins (agrégats cellulaires) qui vont donner les cellules endothéliales et les cellules sanguines [11, 12].

### 1.1.1 Rappel histologique :

Histologiquement ; les capillaires matures ont une paroi constituée de 3 couches :

- Endothélium, monocouche de cellules d'origine mésodermique qui tapisse l'intégralité de l'appareil cardiovasculaire dont les ramifications capillaires les plus fines sont constituées de la seule cellule endothéliale.
- Une couche de cellules appelées péricytes, entourées partiellement par l'endothélium
- Une membrane basale contenant les cellules endothéliales et les péricytes.



*Figure 1 : Schéma d'un vaisseau sanguin*

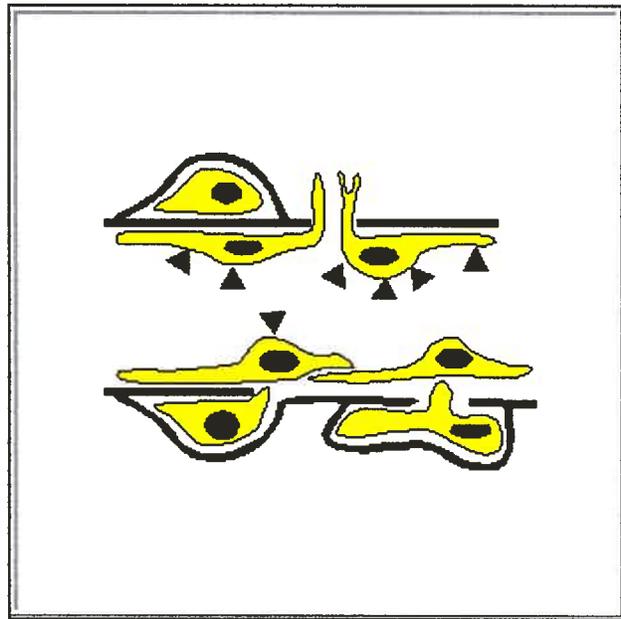
### 1.1.2 L'angiogenèse proprement dite :

L'angiogenèse a lieu suite à une stimulation par les facteurs de croissance vasculaire qui vont se lier à leurs récepteurs au niveau des cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales ainsi stimulées vont sécréter des protéases ayant pour rôle de lyser localement la membrane basale entourant les vaisseaux.

Les jonctions entre les cellules endothéliales ainsi altérées, les cellules endothéliales commencent à migrer et passent à travers l'espace créé par la lyse de la membrane basale en direction de la source de stimulation [13].

Outre la multiplication des cellules endothéliales, d'autres phénomènes indépendants interviennent pour créer la néo-vascularisation. Ainsi, la migration des cellules endothéliales paraît indépendante du pouvoir de multiplication des cellules endothéliales.



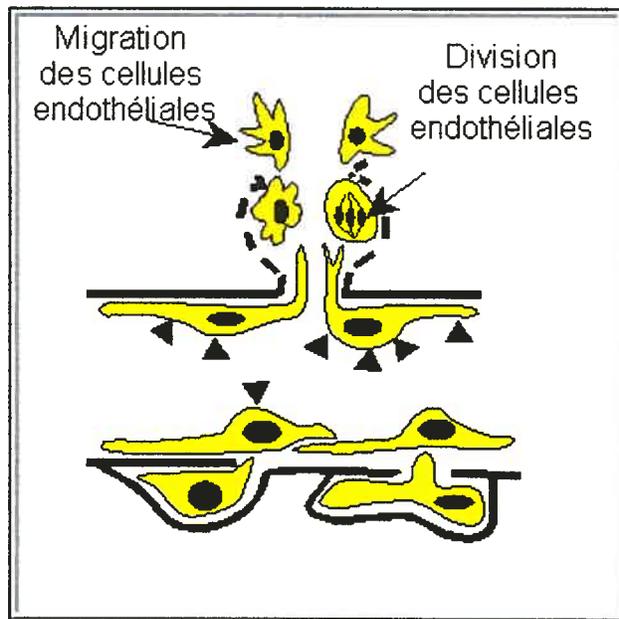
*Figure 2 : Début de la migration des cellules endothéliales*

La forme des cellules endothéliales influence aussi leur prolifération : l'élongation des cellules, en réponse à un stimulus chimiotactique, provoque l'apparition de mitoses. Quand la taille des cellules est réduite (par leur multiplication et leur juxtaposition), le b-FGF devient un facteur de différenciation cellulaire, et perd son pouvoir mitogène.

Les interactions cellulaires au niveau de l'endothélium sont très nombreuses. Les péricytes régulent négativement la prolifération endothéliale.

Donc, on peut dire que la croissance vasculaire ainsi que le maintien de son développement dépendent de divers processus :

- la stimulation de la croissance (facteurs de croissance vasculaire) doit être maintenue
- les cellules endothéliales doivent sécréter des protéases nécessaires pour la lyse de la membrane basale
- les cellules doivent être capables de se déplacer, de migrer ainsi que la division des cellules doit être possible afin d'assurer le nombre nécessaire de cellules [13, 14].



*Figure 3 : Angiogenèse proprement dite.*

### 1.1.3 Les médiateurs de l'angiogenèse :

L'angiogenèse est contrôlée par un équilibre subtil entre les facteurs activateurs et les facteurs inhibiteurs de l'angiogenèse.

#### 1.1.3.1 Médiateurs positifs :

##### *1.1.3.1.1 VEGF :*

La famille des VEGFs comprend cinq membres, VEGF-A à D et Placental GF, qui interagissent avec trois récepteurs, VEGFR-1 à 3.

Le VEGF-A a quatre actions principales sur les cellules endothéliales :

1. Il augmente la perméabilité vasculaire (environ 50000 fois plus que l'histamine).
2. Il est mitogène.
3. Il induit l'angiogenèse sur plusieurs modèles in vitro et in vivo.
4. Il induit l'expression de deux systèmes de protéases : le système activateur du plasminogène/plasmine (uPA, tPA, uPAR et PAI-1) et celui des métalloprotéinases de la matrice.

Il existe quatre isoformes de VEGF-A, dont la principale, le VEGF<sub>165</sub>, se lie à l'héparine.

L'expression de VEGF est modulée par plusieurs facteurs :

- la pression partielle d'oxygène, notamment via un site de liaison dans le gène VEGF pour HIF-1 (*hypoxia inducible factor*),
- des cytokines et des facteurs de croissance, dont TGF- $\beta$ , IGF-1, IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>, NO,
- la transformation cellulaire : des formes mutées de *p53* et de *ras* peuvent augmenter la transcription de VEGF. L'expression de VEGFR-1 et VEGFR-2 est également régulée par l'hypoxie [15, 16].

### Récepteurs à VEGF :

Les récepteurs à VEGF sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase, c'est-à-dire qu'ils s'autophosphorylent pendant l'interaction avec le VEGF et traduisent ainsi le signal. Ces récepteurs possèdent 7 domaines extracellulaires (dont la structure est proche de celle des immunoglobulines) contenant le site de liaison du ligand, une courte séquence intramembranaire et une région intracellulaire comprenant un domaine tyrosine-kinase (certains récepteurs de type 1 peuvent être solubles).

La liaison du VEGF à son récepteur entraîne une dimérisation puis une oligomérisation du récepteur ; ce qui active la tyrosine kinase donnant ainsi une auto et transphosphorylation des résidus tyrosine spécifiques du domaine cytoplasmique. Ceci démasque des sites de liaison de haute affinité pour des protéines contenant des domaines d'homologie à Src (domaines SH2) [17].

D'une manière générale, on distingue 3 types de récepteurs :

- le type 1 (flt1 (Fms like tyrosine kinase-1)) joue un rôle préférentiellement dans la migration
- le type 2 (flk (fetal liver kinase1), KDR) intervient surtout dans la prolifération
- le type 3 est encore mal connu

Une invalidation du récepteur type 2 chez la souris (non viable) conduit à une absence totale de vaisseaux tandis que la suppression de l'expression des récepteurs de type 1 mène à une désorganisation de l'endothélium.

Il existe aussi deux récepteurs dépourvus d'activité tyrosine kinase présents sur les cellules endothéliales et les cellules neuronales, les neuropillines 1 et 2.

#### *1.1.3.1.2 b-FGF :*

FGF : la famille des facteurs de croissance des fibroblastes. C'est une grande famille (18 membres). On leur attribue la fonction de cofacteur avec le VEGF dans la régulation de l'angiogenèse. Ces deux facteurs *in vitro* sont synergiques, c'est-à-dire que leur activité est augmentée quand ils sont ensemble. Les FGF agissent sur des récepteurs de type Tyrosine Kinase. C'est le récepteur de type 1 qui est la cible essentielle dans la cellule endothéliale. Les FGF sont des facteurs redondants, c'est-à-dire qu'un facteur peut prendre la place d'un autre, c'est pourquoi les expériences de KO de gène n'ont rien donné. Le FGF est impliqué dans l'artériogenèse du cœur et des extrémités. Ce FGF provient très probablement des monocytes [18, 19].

#### *1.1.3.1.3 Angiopoïétines 1 et 2 :*

Ces facteurs n'interviennent pas directement dans la formation des vaisseaux. Ils régulent la capacité de la cellule endothéliale d'interagir avec les cellules accessoires (péricytes et CML). L'angiopoïétine 1 se fixe sur le récepteur Tie2 à tyrosine kinase ce qui induit le signal de recrutement des cellules accessoires. L'angiopoïétine 2 bloque ce signal, ce qui forme une balance permettant la stabilisation du vaisseau. Ainsi, les vaisseaux stables ne sont plus dépendants du VEGF, contrairement aux vaisseaux immatures. L'angiopoïétine régule donc la sensibilité des vaisseaux aux facteurs de survie [18, 19].

#### *1.1.3.1.4 HIF $\alpha$ (Hypoxia Inducing Factor) :*

Le facteur HIF $\alpha$  est, en présence d'une quantité suffisante d'O<sub>2</sub>, hydroxylé sur une proline. Cette proline hydroxylée peut ensuite être reconnue par la protéine VHL (von Hippel-Lindeau). Ce complexe recrute d'autres protéines, ce qui lui

permet d'être reconnu et dégradé par un protéasome. La présence d'une quantité suffisante d'O<sub>2</sub>, en permettant l'hydroxylation de HIF $\alpha$ , permet donc de maintenir un taux de HIF $\alpha$  faible. Or HIF $\alpha$  est un facteur de transcription de VEGF, d'où le rôle de l'O<sub>2</sub> dans la régulation de l'angiogenèse. En situation d'hypoxie, l'HIF $\alpha$  n'est pas dégradé et une quantité importante de VEGF est ainsi synthétisée [18].

#### *1.1.3.1.5 L'héparine :*

L'héparine et le sulfate d'héparine constituent des éléments régulateurs majeurs de l'angiogénèse. Ainsi, vis-à-vis des facteurs de croissance fibroblastiques, l'héparine potentialise l'effet mitogénique du FGF acide. Elle stabilise et protège les facteurs FGF de l'inactivation, et fonctionne comme un récepteur de faible affinité qui séquestre le facteur bFGF et facilite son interaction avec les récepteurs cellulaires de haute affinité.

Du fait de leur séquestration, en grande abondance, dans l'espace péri-cellulaire, par l'héparine et les autres protéoglycanes, les facteurs FGF sont le plus souvent inactifs. Ils sont relargués et activés, grâce à des héparinases, après un traumatisme local minime, une irradiation, une inflammation, un choc thermique ou une nécrose tumorale, et entraînent la prolifération des cellules endothéliales et fibroblastiques nécessaires pour la réparation, la cicatrisation ou la poursuite de la prolifération tumorale.

Les cellules inflammatoires et les cellules tumorales possèdent des héparinases qui entraînent la migration cellulaire, l'invasion et la réaction vasculaire. D'autres héparinases peuvent agir : thrombine, plasmine [20].

#### *1.1.3.2 Inhibiteurs de l'angiogénèse :*

Dans des conditions physiologiques normales, de très nombreux facteurs négatifs ne permettent l'expression des facteurs angiogéniques que dans des

situations particulières (embryogenèse, inflammation, cicatrisation, menstruation).

#### *1.1.3.2.1 L'angiostatine :*

L'angiostatine est la première molécule isolée comme inhibiteur potentiel de l'angiogenèse tumorale. Il s'agit d'un produit de dégradation du plasminogène. L'angiostatine est un inhibiteur endothélial spécifique non seulement de la prolifération cellulaire mais également de la migration endothéliale [21].

#### *1.1.3.2.2 L'endostatine :*

L'endostatine est un fragment de dégradation du collagène XVIII. C'est un inhibiteur endothélial spécifique très puissant qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales microvasculaires. L'endostatine inhibe la croissance de la tumeur primaire ainsi que l'établissement et la croissance des métastases. L'angiostatine et l'endostatine agissent de façon synergique et entraînent la régression complète de la tumeur, sans rechute après l'arrêt du traitement [22, 23].

#### *1.1.3.2.3 Les autres facteurs anti-angiogéniques naturels :*

La thrombospondine est un inhibiteur de la prolifération cellulaire endothéliale, de la mobilité et de la morphogénèse. Les interférons ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ) peuvent inhiber la migration des cellules endothéliales capillaires, une étape critique de l'angiogénèse.

Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles inhibent l'angiogenèse et ainsi la croissance tumorale et l'invasion. Les métalloprotéinases matricielles, en dégradant la matrice extracellulaire, jouent un rôle important dans la progression tumorale [24].

## 1.2 Angiogenèse pathologique :

Dans des conditions physiologiques normales, cette néovascularisation est finement contrôlée et joue un rôle fondamental dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune (*corpus luteum*) et du placenta), la réparation tissulaire lors de blessures et d'ischémies cardiaque et périphérique, ainsi que dans le développement embryonnaire [5]. L'angiogenèse peut cependant devenir pathologique lorsque la croissance des nouveaux capillaires devient incontrôlée.

### 1.2.1 Angiogenèse et tumeur :

L'étude de l'angiogenèse au cours de la croissance des tumeurs constitue un secteur de recherche en pleine effervescence. Cet intérêt provient de résultats importants, tant au niveau fondamental que clinique, montrant que la progression tumorale est très étroitement liée au degré de néovascularisation intratumorale [25].

En effet, la perturbation de l'équilibre existant *in vivo* entre les niveaux d'activateurs et d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse entraînerait la conversion au phénotype angiogénique. Les mécanismes responsables de ce dérèglement demeurent encore largement incompris, mais la perturbation de l'équilibre en faveur d'une stimulation doit faire intervenir, soit une production accrue de composés angiogéniques, soit une baisse marquée des niveaux d'inhibiteurs, leurs demi-vie dans la circulation étant beaucoup plus longues

que celles des activateurs (2-3 jours pour l'angiostatine comparés à 3 minutes pour le VEGF et 30 minutes pour le bFGF) [20] .

Ainsi, dans les tumeurs, les cellules cancéreuses voient leur production de facteurs angiogéniques (VEGF, bFGF) augmenter spectaculairement, soit à la suite d'une stimulation par les conditions hypoxiques, soit encore par l'activation de certains oncogènes ; on observe alors une baisse concomitante de la production d'inhibiteurs de l'angiogenèse comme la thrombospondine, l'angiostatine ... Il en résulte une néovascularisation intensive qui permet à la tumeur de croître dans le tissu hôte et, éventuellement, de coloniser des sites secondaires.

- **Angiogenèse tumorale versus angiogenèse embryonnaire :**

Durant le développement embryonnaire, le VEGF conduit à la différenciation et à la prolifération endothéliale à partir de ses précurseurs (l'hémangioblaste et l'angioblaste), et forme ainsi un plexus vasculaire primitif peu différencié (étape vasculo-génétique). L'angiopoïétine-1 (ang-1) induit le remodelage du plexus vasculaire pour conduire à un système vasculaire hiérarchiquement structuré et mature par division des cellules endothéliales, élagage sélectif et par le recrutement des péricytes (angiogenèse). Durant l'angiogenèse tumorale, l'angiopoïétine-2 (ang-2) déstabilise la paroi des vaisseaux sanguins matures. Ceci permet aux cellules endothéliales quiescentes de proliférer et de migrer en réponse au VEGF ou à d'autres facteurs angiogéniques pour former de nouveaux vaisseaux. Des progéniteurs des cellules endothéliales, dérivés de la moelle osseuse, peuvent être trouvés dans le sang périphérique et aux sites de l'angiogenèse [26].

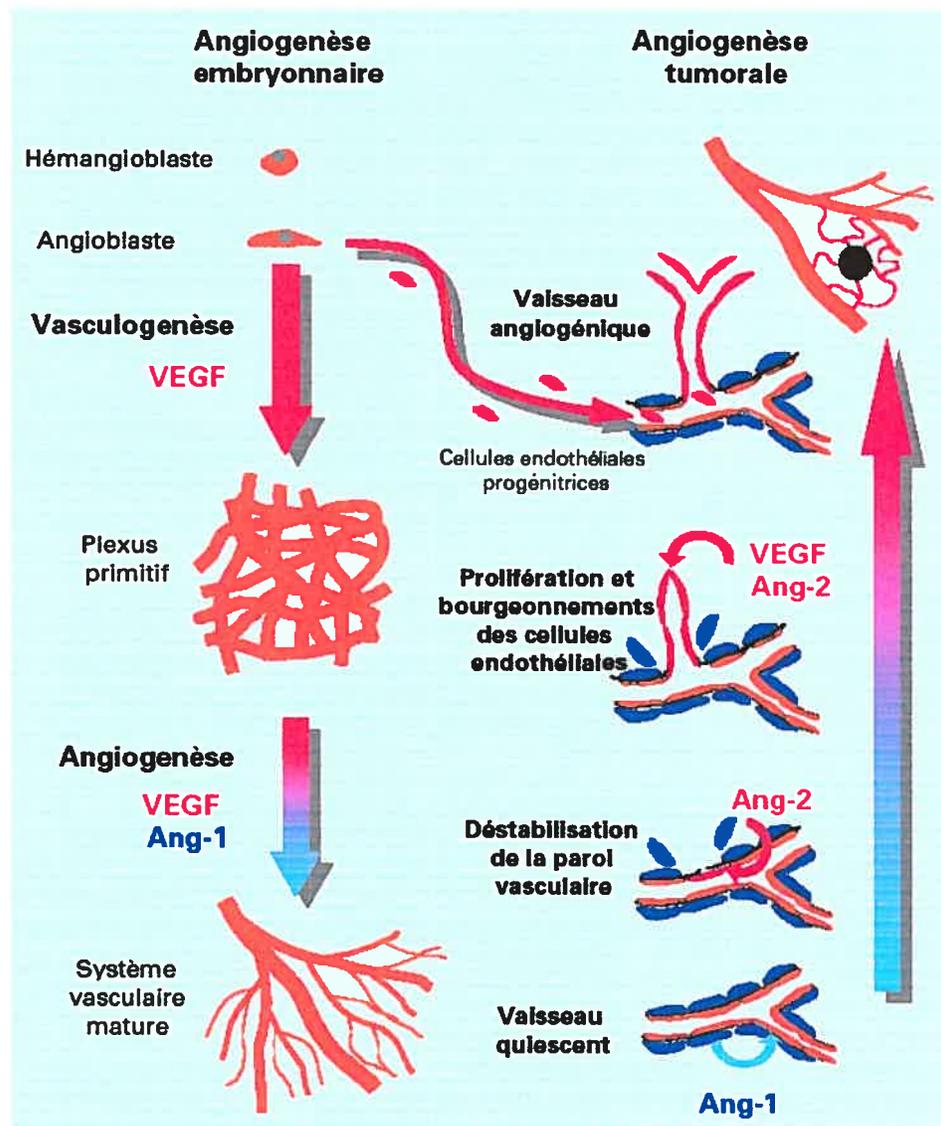


Figure 4 : Formation de vaisseaux sanguins chez l'embryon et angiogenèse tumorale [26]

- **Rôle de l'angiogenèse dans la progression tumorale : données expérimentales :**

Plusieurs études indépendantes ont suggéré, par des voies directes ou indirectes que l'angiogenèse est étroitement liée à la progression tumorale.

**a- Preuves indirectes :**

- La croissance de tumeurs dans des organes isolés où les vaisseaux sanguins ne grandissent pas est limitée à  $1-2 \text{ mm}^3$  mais augmente rapidement à  $1-2 \text{ cm}^3$  après vascularisation.

- Des tumeurs avasculaires suspendues dans l'humeur aqueuse de l'œil, dans la cornée, ou dans des chambres transparentes sous-cutanées chez la souris sont limitées à  $1 \text{ mm}^3$  mais ce volume augmente de plusieurs fois à la suite d'une induction de la vascularisation.

- Des métastases de rétinoblastomes présentes dans l'humeur aqueuse demeurent avasculaires et ne croissent pas.

- L'intensité du marquage à la thymidine tritiée des cellules tumorales est corrélée à celle des cellules vasculaires présentes dans la tumeur.

- L'implantation de tumeurs sur la membrane chorio-allantoïde de l'embryon de poulet a montré que la croissance tumorale est induite par la vascularisation de l'embryon. La réduction de cette vascularisation embryonnaire, observée avec l'âge, est directement corrélée à un ralentissement de la croissance tumorale.

- Les tumeurs de taille supérieure à  $1 \text{ mm}^3$  sont toujours vascularisées (tumeurs hépatiques de lapin).

- Le carcinome ovarien produit des petites métastases avasculaires au niveau de la membrane péritonéale qui demeurent bénignes si elles ne sont pas vascularisées.

- L'apparition de la néovascularisation dans les mélanomes humains est associée à leur croissance et à la formation de métastases.

- Chez une souris transgénique développant des carcinomes pancréatiques, la néovascularisation est cruciale pour la transition de l'hyperplasie à la néoplasie.

- La transplantation sous-cutanée d'une tumeur chez la souris provoque une accélération de la croissance tumorale associée à une augmentation importante des vaisseaux sanguins.

- L'apparition du phénotype angiogénique durant la tumorigenèse des fibrosarcomes est associée à la sécrétion d'un facteur de croissance des cellules endothéliales (bFGF) [27].

### **b- Preuves directes :**

- Un inhibiteur spécifique de l'angiogenèse (AGM 1470) inhibe la croissance tumorale in vivo.

- Des anticorps monoclonaux neutralisant des mitogènes inducteurs de l'angiogenèse, comme le bFGF, le VEGF et l'endogline induisent des rémissions de tumeurs.

- Un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ , protéine impliquée dans la migration cellulaire, bloque l'angiogenèse et la croissance tumorale.

- Un mutant négatif de la protéine Flk-1, un récepteur du VEGF, inhibe la croissance de glioblastomes.

- Une protéine sécrétée par une tumeur primaire, l'angiostatine, inhibe la formation de métastases chez la souris [27].

### **• Lymphangiogenèse tumorale :**

"En plus des vaisseaux sanguins, le stroma tumoral contient également des vaisseaux lymphatiques. Les cellules tumorales peuvent utiliser ces vaisseaux lymphatiques comme route préférentielle pour la métastatisation des ganglions lymphatiques. Cette hypothèse a récemment été confirmée par des travaux démontrant que la métastatisation au niveau des ganglions lymphatiques dans des modèles de cancer chez la souris était favorisée après stimulation de la lymphangiogenèse aux sites des tumeurs. Le rôle supposé de la

lymphoangiogenèse, comme facteur favorisant la métastase des ganglions lymphatiques dans les cancers humains, est suggéré par l'observation que bien des tumeurs expriment des facteurs lymphangiogéniques (par exemple le VEGF-C). L'importance clinique de la lymphangiogenèse comme facteur favorisant la métastatisation des ganglions lymphatiques dans les cancers humains n'est cependant pas connue pour le moment" [26].

### 1.2.2 Autres pathologies :

Quand la croissance des nouveaux capillaires est incontrôlée, il s'agit d'angiogenèse pathologiques. Ainsi une néovascularisation excessive peut concourir à la progression de diverses maladies comme les rétinopathies, les hémangiomes infantiles, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, les ulcères duodénaux.

## 1.3 Les méthodes d'études :

### 1.3.1 Les tests in vitro :

#### 1.3.1.1 Les tests sur cultures cellulaires :

La formation de nouveaux vaisseaux est la résultante de plusieurs processus simultanés : dégradation protéolytique de la matrice sous endothéliale vasculaire, migration et prolifération des cellules endothéliales puis constitution d'une lumière vasculaire. Ces différentes étapes, à savoir la prolifération, la migration et la formation de tube, constituent autant de cibles potentielles d'intervention qui permettent de moduler l'angiogenèse et donc peuvent être utilisées pour son étude [28].

#### *1.3.1.1.1 Test de prolifération cellulaire :*

Il existe plusieurs techniques bien établies permettant la mesure de la prolifération cellulaire. La plus fréquemment utilisée est celle qui mesure le taux d'incorporation de thymidine. Elle a permis de mettre en évidence plusieurs problèmes limitant la validation de l'étude de l'angiogenèse in vitro. En effet, il existe un problème subtil mais très important. Les cellules endothéliales utilisées pour tester l'activité antiangiogénique proviennent de deux sources principales, à savoir l'aorte bovine et la veine ombilicale humaine. Cependant, toutes les cellules endothéliales ne sont pas identiques. Comme l'indique la littérature, il y a non seulement des différences entre les cellules issues de vaisseaux de grand calibre et celles issues de microvaisseaux, mais aussi entre les vaisseaux de différentes espèces. En effet, les cellules endothéliales d'origine humaine se lient à l'agglutinine Ulex europeus alors que les cellules d'origine murine et porcine ne réagissent pas. De plus, ce qui est probablement le détail le plus important, les cellules endothéliales utilisées sont dans un état prolifératif et donc différent des cellules endothéliales de la vascularisation humaine qui sont à l'état quiescent. Par ailleurs, il est bien connu que les cellules cultivées in vitro peuvent aussi bien gagner ou perdre certaines de leurs propriétés connues in vivo, et il est généralement difficile d'utiliser des cellules endothéliales primaires pour l'étude de l'angiogenèse [6, 29-31].

#### *1.3.1.1.2 Test de migration cellulaire :*

Plusieurs tests peuvent être utilisés pour déterminer la migration des cellules endothéliales en réponse à des inducteurs ou des inhibiteurs angiogéniques [32].

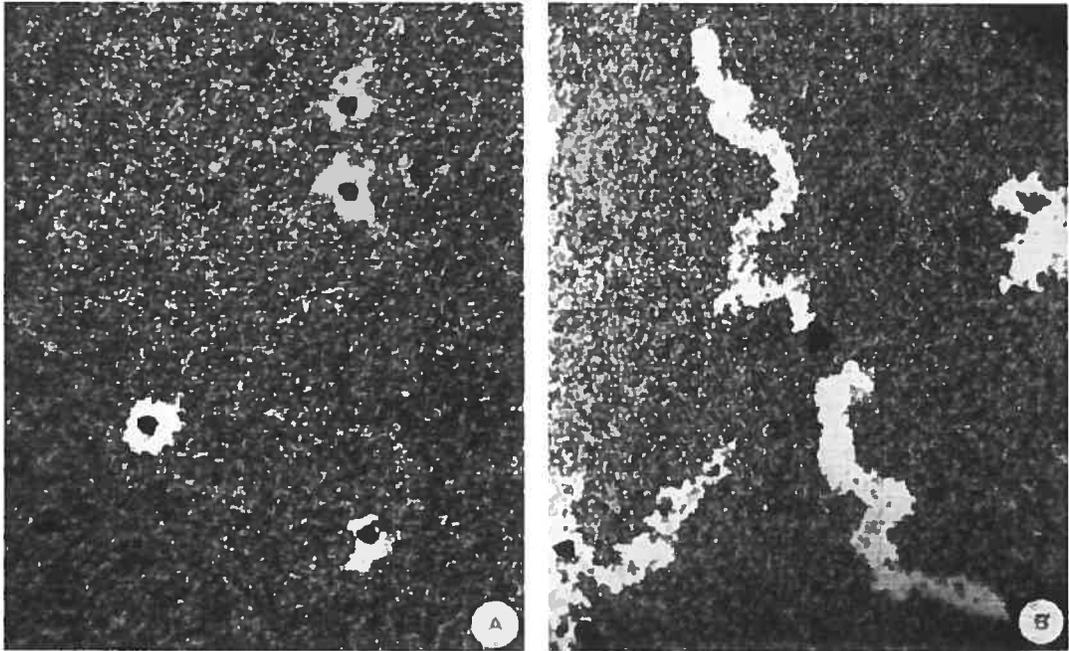
La plus fréquemment utilisée est la chambre chimiotactique « blind-well ». Il s'agit d'une chambre de Boyden modifiée comme celle utilisée pour la

migration neutrophile classique. Dans ce cas, les cellules endothéliales sont placées sur la partie supérieure d'un filtre perméable aux cellules permettant ainsi leur migration en réponse au produit à tester qui est placé sous le filtre. La méthode de mesure la plus précise nécessite une énumération des cellules après séparation des celles qui ont été retenues de celles qui ont migré à travers le filtre. Ce système se prête au test des gradients de concentrations qui peut refléter les conditions présentes *in vivo*.

Cependant, les cellules endothéliales des microvaisseaux sont délicates. De plus, l'énumération des cellules qui ont migré est fastidieuse, et les efforts pour adapter la chambre de migration à des plaques de 96 puits ont eu un résultat mitigé.

Certains laboratoires ont développé un test de migration cellulaire bidimensionnel dans des plaques de 96 puits qui mesure et quantifie la mobilité cellulaire [33]. Comme le montre la figure 5, une monocouche de 1 $\mu$ m de perles (beads) est déposée au fond des puits. Les cellules endothéliales (100 cellules/puits) sont par la suite placées avec le produit à tester et le milieu de culture. Le mouvement des cellules est quantifié 24h après la mise en culture, et le test se prête à une quantification automatisée [34] [32].

La technique est très utile pour tester aussi bien des inhibiteurs telle que l'endostatine ou le TNP 470 que des inducteurs comme le FGF-2 ou le VEGF. Compte tenu de sa simplicité, cette méthode permet l'utilisation de différents types de cellules endothéliales et non endothéliales afin de contrôler la spécificité des réponses observées [35].



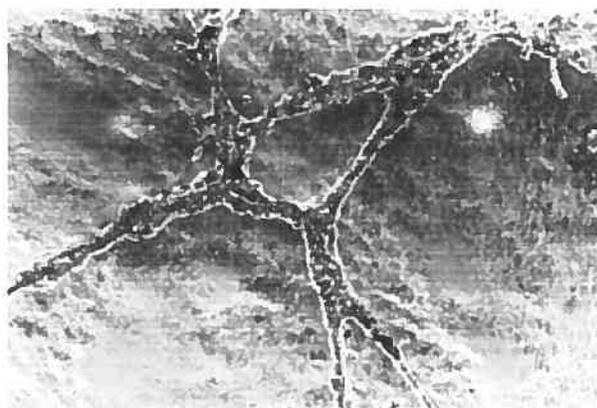
*Figure 5 : Test de migration cellulaire (traçage phagocinétique ) [28, 34]*

La photo A de la figure montre des cellules Eoma à faible concentration dans du sérum bovin foetal (10 ml/l) 24h après la mise en culture alors que la photo B montre une culture des mêmes cellules dans du sérum à 50 ml/l. Ce qui montre qu'une concentration plus importante de sérum permet une meilleure migration des cellules Eoma.

#### *1.3.1.1.3 La formation tubulaire (Fig n°6) :*

Un des tests les plus spécifiques pour l'étude de l'angiogenèse est celui mesurant l'aptitude des cellules endothéliales à former des structures tridimensionnelles (formation tubulaire). Les cellules endothéliales, quelle que soit leur origine, semblent être capables de former spontanément des tubules [36].

La formation tubulaire peut être stimulée par l'utilisation de caillot de collagène ou de fibrine pour couvrir les plaques de culture. Dans ces conditions, la formation tubulaire reflète fidèlement la situation in vivo, et la formation de jonctions étroites peut être confirmée par microscopie électronique. Avec la découverte du fait que le matrigel permet une formation tubulaire dans les 24h suivant la mise en culture ; ce test constitue une avancée des techniques permettant de mesurer l'angiogenèse. Cependant, les cellules d'origine non endothéliales, comme les fibroblastes, peuvent réagir avec le matrigel. Il est aussi indispensable de vérifier la concentration en protéines du matrigel utilisé, vu que la stimulation de la formation tubulaire n'est pas retrouvée avec toutes les préparations commerciales du matrigel [34].



*Figure 6 : Formation tubulaire à partir des cellules endothéliales de myocarde murin dans du matrigel 24h après la mise en culture [37]*

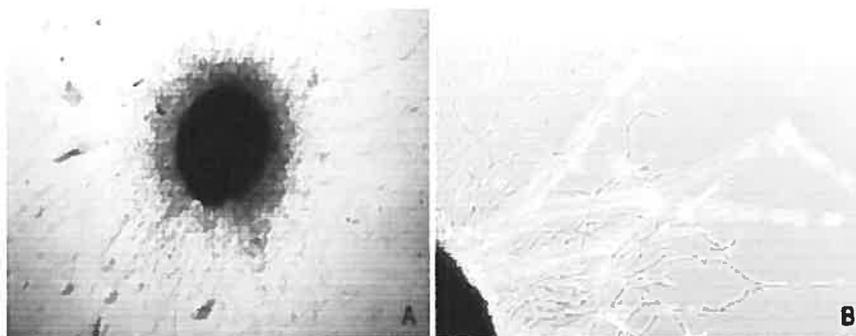
### 1.3.1.2 Les tests sur cultures d'organes :

#### *1.3.1.2.1 Test sur anneau d'aorte de rat :*

La reconnaissance que l'angiogenèse in vivo implique non seulement les cellules endothéliales mais aussi les cellules environnantes a orienté l'étude de l'angiogenèse vers les méthodes de culture d'organe.

Le test sur anneau d'aorte de rat (fig n° 7) est la technique la plus utilisée [9]. Il consiste à découper l'aorte abdominale de rat en anneaux de 1 millimètre d'épaisseur qui sont mis en culture dans une matrice contenant un milieu tel que le matrigel. Sept à quatorze jours après, la croissance de nouveaux vaisseaux est étudiée permettant de déterminer à quel point elle est affectée par l'ajout de substances inhibitrices ou inductrices.

Cette quantification est complétée par la mesure de longueur et de la densité des extensions vasculaires à partir de l'anneau [38].



*Figure 7: Croissance vasculaire à partir d'anneau d'aorte de rat [28].*

L'utilisation de marqueurs spécifiques de l'endothélium, comme la BSL-I fluorescéine marquée, permet une quantification par comptage de pixel [28].

Antérieurement, les conditions de culture nécessitaient un milieu complexe et le monitoring de la croissance durait au minimum une semaine, mais les

modifications récentes ont permis l'utilisation d'un milieu de culture bien défini et de raccourcir la durée de culture.

Ce test *in vitro* est considéré comme celui qui reflète le mieux la situation *in vivo*, non seulement parce qu'elle implique les cellules non endothéliales environnantes mais aussi parce que les cellules endothéliales utilisées ne sont pas présélectionnées et ne sont pas dans un état prolifératif au moment de la mise en culture. Cependant l'angiogenèse est un événement principalement micro-vasculaire, et donc l'aorte ne représente pas le meilleur choix [28].

#### *1.3.1.2.2 Test sur aorte de poulet :*

Ce test constitue une modification majeure du test sur anneau d'aorte de rat. Développé initialement dans le but spécifique de tester la thalidomide, connue pour avoir une action limitée chez les rongeurs et des effets plus importants chez les embryons de poulets, le test évite l'utilisation des animaux de laboratoire; il est rapide avec un temps d'expérience de 1 à 3 jours et peut être pratiqué dans un milieu de culture sans sérum [39].

La crosse d'aorte est prélevée à partir d'embryon de poulet de 12 à 14 jours, l'aorte sera par la suite découpée en anneaux qui seront placés dans du matrigel. La croissance des cellules avec apparition de structures vasculaires survient dans les 48 heures qui suivent la mise en culture.

Des facteurs inducteurs ou inhibiteurs de croissance vasculaire peuvent être ajoutés au milieu de culture, où leurs effets peuvent être facilement mesurés.

Comme pour les anneaux d'aorte de rat, la quantification de la croissance des cellules endothéliales peut être complétée par l'utilisation de lectines marquées à la fluorescéine comme BSL-I ou BSL-B4 ou par l'utilisation d'anticorps marqués.

Les techniques d'imagerie standard sont utiles pour compter les cellules endothéliales ainsi que pour délimiter la surface de croissance vasculaire.

Contrairement à l'aorte adulte, les cellules endothéliales d'aorte d'embryon partagent plusieurs propriétés avec celles des cellules endothéliales des microvaisseaux. Cependant, elles sont prélevées à partir d'embryons en croissance et donc vont subir la division cellulaire avant la mise en culture et l'exposition aux médiateurs angiogéniques [39].

### 1.3.2 Les tests in vivo :

Il semblerait que l'évaluation des facteurs influençant l'angiogenèse est meilleure dans les tests pratiqués in vivo. Un des premiers tests in vivo implique la préparation de chambres de diffusion faites de filtres millipores, ainsi que les techniques conçues de façon à permettre le monitoring visuel de la progression des néovascularisations de tumeurs greffées.

Les observations histologiques fournissent des informations très détaillées concernant l'angiogenèse in vivo. Ces informations peuvent être quantifiées par l'utilisation de techniques de monitoring du flux sanguin par Doppler ou approches radiologiques [40].

Plusieurs techniques ont été développées pour étudier l'angiogenèse in vivo, à savoir le test sur membrane chorio-allantoïque de poulet, le test sur bouchon de matrigel ainsi qu'un groupe de tests utilisant des implants d'éponges contenant des cellules ou des substances à tester.

#### 1.3.2.1 Test sur embryon de poulet :

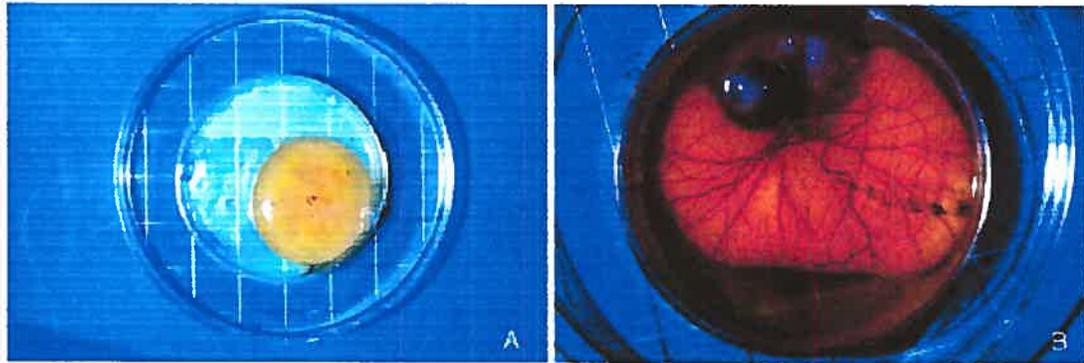
Le test original sur membrane chorio-allantoïque (CAM) de poulet a été décrit par les embryologistes il y a déjà une cinquantaine années et il a longtemps constitué la technique de base pour l'étude des organes en cours de développement.

L'expérience originale consistait à découvrir la CAM d'embryon de poulet de 7 à 9 jours en faisant une ouverture dans la coquille, sur laquelle les greffons de tissus ou d'organes étaient placés directement. La fenêtre était scellée et l'œuf re-incubé.

Après un temps d'incubation approprié, les greffons étaient récupérés afin de pouvoir mesurer leurs croissances et leurs néo-vascularisations.

Initialement, l'évaluation de la réaction angiogénique est limitée à un classement en stades allant de 0 à 4. Plus récemment, les techniques de traitement d'images permettant par exemple le comptage des points de bifurcation des vaisseaux dans une surface bien déterminée, ont contribué à améliorer la quantification de ce test [41].

Une modification de cette méthode in ovo, consiste à transférer le contenu de l'œuf dans une boîte de pétri après 72 heures d'incubation (culture d'embryon entier) (fig n°8 photo A) [28]. Même si techniquement, ce test peut être considéré comme une méthode in vitro, il s'agit d'une technique pratiquée entièrement chez l'animal et donc in vivo.



*Figure 8 : Test sur membrane chorio-allantoïque [42]*

La photo A représente un embryon de poulet placé dans une boîte de pétri après 72h d'incubation, la photo B représente un embryon de poulet après une semaine de croissance.

Après 3 à 6 jours additionnels d'incubation durant lesquels la CAM se développe, les greffons peuvent être placés plus facilement que lorsque le test est pratiqué dans l'œuf et ils sont suivis durant toute la durée de leur développement.

Les substances à tester sont déposées directement sur la CAM ou sous le couvercle de la boîte de pétri. Les inhibiteurs peuvent être évalués en étudiant leurs effets sur le développement normal de la vascularisation de la CAM ou également sur l'angiogenèse induite par des facteurs de croissance tel le bFGF (fig n° 9) [41].



*Figure 9 : effet du bFGF placé sous le couvercle de la boîte de pétri (photo de gauche à 0h, photo de droite à 72h) [41]*

Cette technique présente plusieurs avantages :

- Disponibilité du matériel expérimental
- Possibilité de pratiquer plusieurs tests sur une même membrane et de surveiller la réaction angiogénique tout au long de l'expérience.

Cependant, le test est pratiqué sur des cellules de poulet ce qui limite fortement son utilité ; de plus, la CAM elle-même subit aussi bien des changements rapides sur le plan morphologique qu'en terme de changements graduels dans

le taux de prolifération des cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire.

### 1.3.2.2 Test sur cornée :

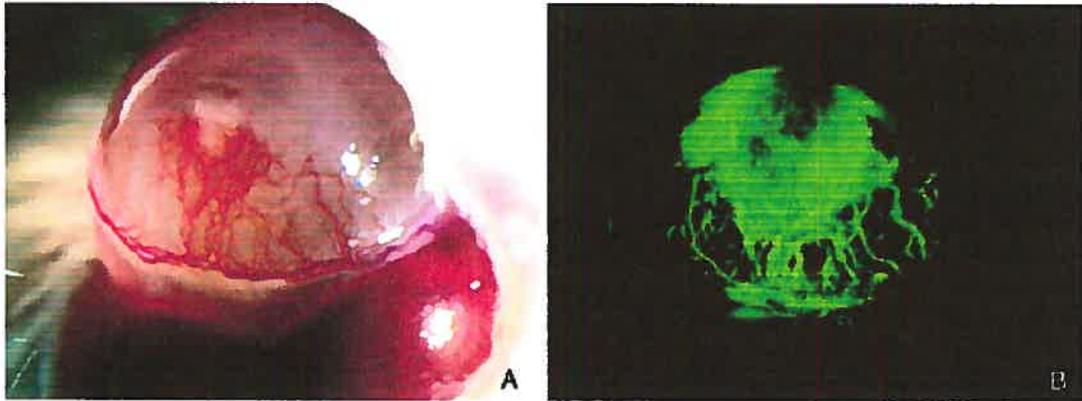
Ce test est toujours considéré comme l'un des meilleurs tests *in vivo*. Puisque la cornée est normalement avasculaire, chaque vaisseau observé suite à une stimulation angiogénique ne peut être qu'un nouveau vaisseau.

La technique a été initialement développée sur des yeux de lapins, elle a par la suite été adaptée à la cornée de souris, animal le plus fréquemment utilisé en expérimentation [43, 44].

En résumé, la technique consiste à faire une poche dans la rétine de l'animal. Quand les tissus ou tumeurs tests sont introduites dans cette poche, on assiste à une croissance de nouveaux vaisseaux à partir de la vascularisation limbale périphérique.

Les substances inhibitrices à tester peuvent être administrées par voie orale ou systémique (par injection bolus ou implant de pompe osmotique) [45, 46].

La réponse vasculaire sera évaluée par observation directe tout au long de l'expérience. Ceci nécessite une lampe « slit » pour le lapin mais seulement une stéréo-microscopie pour la souris. La visualisation définitive de la vascularisation de la cornée de souris sera complétée par l'injection d'encre d'inde. Plus récemment, l'utilisation de dextran de haut poids moléculaire marqué avec un fluorochrome est devenue une méthode de choix. Les méthodes de quantification incluent la mesure de surface de pénétration vasculaire, la progression des vaisseaux vers le stimulus angiogénique, ou, en cas d'utilisation de fluorescence, un comptage de pixels (fig n°10) [47].



*Figure 10 : Angiogenèse induite par bFGF dans la cornée de souris*  
[47]

L'étude de l'angiogenèse sur la cornée présente plusieurs avantages :

- Possibilité d'évaluer la progression de l'angiogenèse
- Absence de vascularisation préexistante dans la cornée
- Possibilité de faire les expériences sur les souris.

Cependant, étant donnée la délicatesse de la procédure chirurgicale, peu de greffes peuvent être pratiquées en une seule expérience. De plus, l'espace disponible pour introduire les produits à tester est limitant, la réaction inflammatoire est difficile à éviter et le site, bien qu'idéal pour la visualisation, est atypique précisément parce que la cornée est avasculaire.

### 1.3.2.3 Test sur bouchon de matrigel :

Contrairement au test sur cornée de souris qui nécessite une habileté considérable, ce test n'est pas difficile à réaliser.

Le matrigel contenant des substances ou cellules à tester est injecté en sous cutané à des souris, il forme ainsi un bouchon qui sera récupéré 7 à 21 jours après afin d'être analysé. Une analyse histologique permet de déterminer l'extension avec laquelle les vaisseaux sanguins s'y sont développés.

La quantification peut se faire par une mesure de fluorescence notamment en utilisant le dextran marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC). Elle peut être complétée par la mesure du taux d'hémoglobine contenu dans le bouchon de matrigel. Cependant, ceci peut être trompeur vu que le taux sanguin des constituants varie avec la taille des vaisseaux sanguins [48].

Certains laboratoires ont modifié ce test afin de permettre un meilleur traçage de la néovascularisation. Cette modification consiste à introduire le matrigel seul en premier chez la souris, puis l'éponge ou le fragment de tissu est placé dans le bouchon. Les nouveaux vaisseaux peuvent donc être quantifiés en utilisant le dextran-FITC.

Mais ce modèle présente le désavantage de nécessiter plus de temps d'étude que le modèle standard [46].

#### 1.4 Les méthodes d'inhibition :

La compréhension que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse, a entraîné le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques visant la vascularisation tumorale.

Les inhibiteurs de l'angiogenèse exercent une activité anti-néoplasique dans les modèles expérimentaux. En se basant sur ces résultats précliniques prometteurs, plusieurs composés anti-angiogéniques ont été développés.

L'angiogenèse est un processus se déroulant en plusieurs étapes, il pourrait donc, être bloqué en intervenant sur l'une de ces étapes. Ainsi, la production et l'activité des produits angiogéniques, leur interaction avec les récepteurs à la surface des cellules endothéliales, les voies de signalisation et l'activation des cellules endothéliales suite à ces stimuli, constitueraient des cibles potentielles de thérapie antiangiogénique [49].

En effet, les vaisseaux normaux et intra-tumoraux sont phénotypiquement différents et leur formation est caractérisée par une augmentation des nombres de fenestration, une architecture anormale avec des shunts artério-veineux. Les cellules endothéliales tumorales peuvent se diviser 50 fois plus fréquemment que les cellules endothéliales normales et expriment excessivement des molécules spécifiques telles l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$ , la sélectine-E, l'endogline, l'endosialine et les récepteurs du VEGF. Les cellules endothéliales tumorales peuvent sécréter certains facteurs ayant pour rôle de soutenir aussi bien leur propre croissance (par voie autocrine) que celle du parenchyme tumoral (par voie paracrine). Cependant, il existe une stimulation mutuelle entre le stroma et le parenchyme tumoral qui soutient la croissance et la progression tumorale ainsi que la formation de métastases.

Dans les structures tissulaires, la diffusion limite de l'oxygène correspond à une distance de 100 à 200  $\mu\text{m}$  et dans les tumeurs solides cet espace constituerait 3 à 5 lignes de cellules entourant un seul vaisseau. Donc, le système cellule-capillaire tumoral devrait être considéré comme une unité fonctionnelle pour la croissance tumorale.

Les cellules endothéliales activées constituent une cible primaire pour les inhibiteurs de l'angiogenèse. Il s'agit d'agents modificateurs de la réponse biologique qui affectent la croissance tumorale indirectement.

Plusieurs alternatives ont été proposées pour classer les agents antiangiogéniques. En effet, on peut les diviser en agents directs comme ceux bloquant l'aptitude des cellules endothéliales à proliférer, migrer ou former de nouveaux vaisseaux, et des agents indirects qui inhibent la production de facteurs pro-angiogéniques ou leurs récepteurs. Une deuxième classification proposée par Folkman [50], présente les agents antiangiogéniques en 3 catégories :

- les produits de 1<sup>ère</sup> génération qui ralentissent la croissance tumorale chez le modèle animal mais sans réponse majeure comme les interférons, le thalidomide et les inhibiteurs de matrice métalloprotéinase,

- les produits de 2<sup>ème</sup> génération qui induisent la stabilisation de la maladie et fréquemment la régression de la tumeur comme les anti VEGF et les anticorps anti-intégrine  $\alpha_v\beta_3$ ,

- les produits de 3<sup>ème</sup> génération qui sont probablement curatifs comme l'angiostatine, l'endostatine et TSP-1.

En se basant sur le mécanisme d'action de ces inhibiteurs de l'angiogenèse, on peut les classer en :

- inhibiteurs des cellules endothéliales,
- inhibiteurs des facteurs de croissance endothéliaux
- inhibiteurs de la matrice métallo protéinase.

La classification adoptée dans ce qui va suivre correspond à cette dernière alternative.

#### 1.4.1 Les différents mécanismes d'action :

##### 1.4.1.1 Agents inhibiteurs des cellules endothéliales :

Plusieurs inhibiteurs angiogéniques endogènes ou inhibant directement la prolifération des cellules endothéliales sont sous évaluation clinique phase I ou II, que ce soit seuls ou en association à la chimiothérapie.

Ces inhibiteurs peuvent avoir différents mécanismes d'action à savoir :

- l'inhibition de l'Ets (les analogues synthétiques de fumagelline),
- la modulation des intégrines,
- l'inhibition de la pompe  $\text{Na}^+/\text{H}^+$
- l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales en prolifération,
- la déstabilisation tubulaire,

- le blocage de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  présente à la surface des cellules endothéliales

- l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales [51].

Ces composés sont généralement de bas poids moléculaire sauf pour les peptides naturels qui sont des fragments de protéines ; or les protéines mères n'ont aucune activité anti-angiogénique. On cite principalement, l'angiostatine et l'endostatine.

L'angiostatine est un fragment interne du plasminogène humain. Ce composé inhibe la croissance endothéliale in vitro, la néovascularisation chez l'embryon de poulet et la croissance des métastases ainsi que les différents types de tumeurs primaires chez la souris.

L'endostatine est un fragment C-terminal du collagène XVIII, elle a un poids moléculaire de 20kDa. Il s'agit d'un produit isolé d'hémangio-endothélium de souris qui inhibe spécifiquement la prolifération endothéliale, l'angiogenèse et la croissance tumorale in vivo.

Enfin, les deux peptides induisent l'apoptose des cellules endothéliales activées, mais l'endostatine s'avère plus efficace.

Plusieurs autres molécules synthétiques sont en phase II d'essai clinique, notamment : le TNP740, la squalamine, la combretastatine, la vitaxine, l'EMD121974...

Même si ces composés inhibent tous directement les cellules endothéliales, ils ont des cibles moléculaires différentes. En particulier, la combretastatine puisqu'elle induit l'apoptose des cellules endothéliales prolifératives entraînant un blocage du flux sanguin vers les cellules tumorales [52].

### 1.4.1.2 Agents inhibiteurs des facteurs de croissance

#### endothéliaux :

Le VEGF étant un mitogène spécifique des cellules endothéliales produit normalement au cours de l'embryogenèse et de la vie adulte, il s'agit d'un médiateur de l'angiogenèse impliquée dans divers processus physiologiques et pathologiques notamment le développement tumoral.

Eppenberger et al. rapportent que le taux de VEGF tumoral constitue le paramètre pronostic le plus important [53].

L'intervention au niveau des voies du VEGF peut être considérée l'une des cibles primaires puisque les inhibiteurs du VEGF ont montré une activité antitumorale potentielle chez des modèles animaux

Plusieurs stratégies d'inhibition sont possibles.

On distingue :

- l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF protéine ou récepteur,
- l'inhibition du VEGF-R tyrosine kinase,
- l'inhibition du VEGF-R par les ribosymes ciblés [52].

#### ***1.4.1.2.1 L'utilisation d'anticorps monoclonaux :***

Bevacizumab est un anticorps monoclonal anti VEGF soluble. Il se lie au VEGF et prévient son interaction avec ses récepteurs (Flt-1 et KDR) à la surface des cellules endothéliales. Par ailleurs, l'administration du Bevacizumab à des souris « nude » portant une xénogreffe de cancer de colon entraîne une réduction de la croissance microvasculaire ainsi qu'une inhibition de la progression métastatique de la maladie.

Les essais cliniques de phase I ont montré que son utilisation en combinaison avec la chimiothérapie est sans danger. Au cours des études de phase II pratiquées sur des patients atteints de cancer de colon métastasé et de cancer pulmonaire à un stade avancé, on a noté que cette combinaison permet un ralentissement de la progression tumorale et l'obtention d'un meilleur taux de réponse que celui obtenu par la chimiothérapie seule. Actuellement ce produit est en cours d'essai de phase III.

Un autre anticorps le DC101 anti flk1 (fetal liver kinase 1) est en cours de développement [54].

#### ***1.4.1.2.2 L'inhibition du VEGF-R tyrosine kinase :***

Il s'agit d'une autre approche pour bloquer l'activité du VEGF.

Le Semaxanib : SU5416 est une petite molécule synthétique inhibitrice spécifique du VEGF R2 (flk, KDR) tyrosine kinase. En effet, les études biochimiques montrent une inhibition compétitive de l'activité tyrosine kinase Flk1/KDR avec un  $K_i$  de  $0,16 \cdot 10^{-3}$  mol/L. De plus, SU5416 est aussi un puissant inhibiteur du récepteur du FGF [55].

Cette molécule est actuellement en cours d'essai clinique. In vitro, cette molécule inhibe la prolifération des cellules endothéliales humaines stimulées par le VEGF, alors qu'in vivo elle inhibe la croissance et les métastases de différents types de cancers (poumons, colon, prostate...). Un essai de phase I portant sur 69 cas a montré qu'elle est bien tolérée chez les patients atteints de maladie stable (sarcome de Kaposi, cancer pulmonaires, cancer colorectal, cancer du rein). Récemment, on a démontré que le SU5416 induit l'apoptose des cellules endothéliales et tumorales dans un modèle avec xénogreffe de

cancer de colon métastasé au niveau du foie. Son aptitude à induire l'apoptose des cellules cancéreuses et le manque de vascularisation adéquate pourraient contribuer aux réponses partielles observées.

Cependant, l'étude de R. Longo et al. comparant l'association de SU5416 à la 5FU/Leucovorin à l'utilisation de 5FU/Leucovorin chez 737 cas ne montre pas d'amélioration du taux de réponse ni de ralentissement de la progression tumorale. De plus, la combinaison du SU5416 avec la Cisplatine et Gemcitabine s'associe à une toxicité surprenante, entraînant un taux important d'accidents thrombo-emboliques [52].

Un nouveau produit antiangiogénique, le SU6668 a plusieurs cibles. En effet, il inhibe les récepteurs tyrosine kinase du VEGF, bFGF, PDGF et c-kit. L'évaluation clinique est encore à des stades précoces, mais une étude de phase I a montré une stabilisation de la maladie pendant au moins 4 semaines.

D'autres molécules inhibitrices du VEGF-R tyrosine kinase ont été développées, à savoir :

- le ZD6474, produit utilisé par voie orale, il est actuellement en cours d'investigation clinique de phase I chez des patients atteints de cancer réfractaire aux traitements conventionnels ;
- le PTK787/ZK222584 molécule avec une bonne biodisponibilité orale, elle s'est avérée particulièrement active sur les cellules myélomateuses [52].

#### ***1.4.1.2.3 L'inhibition du VEGF-R par les ribosymes ciblés :***

Il s'agit de ribosymes, enzymes qui agissent en se liant et coupant à des sites spécifiques de l'ARN codant pour les deux récepteurs majeurs du VEGF : Flt1 et KDR, entraînant ainsi une inactivation de ces derniers et une abolition du signal normalement induit par le VEGF.

Récemment des efforts considérables se sont dirigés vers l'application de ces technologies à l'inhibition spécifique de l'expression de gènes. Des stabilisations chimiques ont été développées afin de permettre l'obtention de molécules hautement résistantes aux nucléases sériques et donc utilisables pour des applications in vivo [56].

L'activité antitumorale a été montrée in vivo contre le modèle Lewis de carcinome pulmonaire murin. En effet, leur utilisation permet une inhibition de la croissance des tumeurs primaires et des métastases. De plus, une étude clinique de phase I montre une stabilisation de la maladie pendant une durée variable selon les patients allant de 1 à 6 mois et la seule toxicité observée consiste en une petite réaction au niveau du site d'injection [51].

#### **1.4.1.3 Agents inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles**

##### **MMP :**

Il s'agit d'une famille d'endopeptidases zinc dépendantes qui dégradent les composantes de la matrice extracellulaire. La famille des gènes humains MMP se divise en 5 classes selon leurs structures primaires et la spécificité de leurs substrats [52].

Plusieurs études sur différents types de tumeurs ont noté un accroissement significatif de l'expression des MMPs au niveau du tissu tumoral comparativement au tissu normal adjacent [57].

Plusieurs produits sont en cours d'essai clinique. On distingue :

- les inhibiteurs naturels de MMP (Neovostat),
- les inhibiteurs synthétiques de MMP (AG3340, COL-3, MM1270, BMS275291)
- les inhibiteurs synthétiques bloquant le TNF $\alpha$  convertase (Marimastat).

Parmi les inhibiteurs de MMP, le premier composé actif testé en clinique après une administration orale est le Marimastat, une MMP synthétique de bas poids moléculaire est un inhibiteur relativement non spécifique de MMP-1-2-3-7 et 9 [52]. Étudié chez de volontaires sains au cours d'essai clinique de phase I, il montre une bonne tolérance. Les douleurs articulaires et musculaires sévères observées chez certains patients sont réversibles à l'arrêt du traitement. Une analyse de 6 études effectuées sur des patients atteints de cancer colorectal, ovarien et de prostate a montré une réponse pharmacologique dose-dépendante. Ces études montrent également que la combinaison du Marimastat avec la chimiothérapie cytotoxique est sans danger. Actuellement, des essais cliniques de phase III investiguent plus amplement l'utilité de cette combinaison dans le traitement du cancer des petites cellules pulmonaires, du carcinome gastrique et pancréatique [51].

Divers autres produits sont en cours d'investigation clinique à savoir : Neovastat, COL-3, MM1270, BMS275291...

#### **1.4.1.4 Agents inhibiteurs avec un mécanisme d'action mal**

##### **connu :**

D'autres molécules montrent une activité anti-angiogénique mais leurs mécanismes d'action demeurent mal connus.

On distingue la thalidomide qui est un dérivé de l'acide glutamique ayant une activité hypnotique sédatrice en dehors de ses propriétés anti-angiogéniques et immuno-modulatrices. Jusqu'à l'heure, son mécanisme d'action n'est que partiellement connu, on suppose qu'il bloque l'activité du  $TNF\alpha$ , l'angiogénèse induite par le bFGF et inhibe l'induction de la COX-2 ainsi que la synthèse des prostaglandines E2.

Après avoir été retirée du marché en 1961 pour avoir causé des effets tératogènes majeurs, la thalidomide connaît aujourd'hui un regain d'intérêt pour son activité anti-angiogénique. La thalidomide est utilisée pour le traitement de gliomes périodiques de haut grade après intervention chirurgicale ou radiothérapie standard externe, avec ou sans chimiothérapie. Trois différentes études [58-60] montrent une activité anti-tumorale en terme de contrôle de la maladie (stabilisation de la maladie ou rémission partielle.

D'autres études ont montré que les résultats les plus prometteurs sont obtenus chez des patients atteints de myélome multiple, ce qui explique l'incorporation de la thalidomide dans le traitement standard des rechutes de myélome [61].

Des analogues de la thalidomide avec une meilleure activité anti-tumorale ont été synthétisés et sont actuellement en cours d'évaluation clinique [52].

#### **1.4.1.5 Nouvelles approches interférant avec le débit sanguin tumoral :**

##### ***1.4.1.5.1 Les stratégies visant à induire la coagulation sanguine intratumorale :***

L'étude de Huang et al. a montré que suite à l'inoculation sous cutané de cellules tumorales à une souris, on assiste à la production de grande quantité d'interféron ce qui entraîne l'expression spécifique au niveau de l'endothélium vasculaire du CMH classe II. Il s'en suit un développement d'anticorps bispécifiques anti CMH-II et une forme tronquée des activateurs de la voie de coagulation extrinsèque tTF [62].

L'administration intraveineuse de ces produits appelés aussi ligand coagulant à la souris entraîne une réduction dramatique de la tumeur sans toxicité au

niveau des autres organes. Cette coagulation sanguine spécifique au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux entraîne un blocage instantané et persistant du débit sanguin tumoral.

L'avantage de cette approche employant le coagulo-ligand est l'utilisation d'une forme tronquée de TF qui est complètement dénuée d'activité coagulatrice tant qu'il est maintenu loin du facteur X. Quand le tTF se lie au facteur X et en présence du facteur VII/VIIa, on assiste à l'induction de la cascade de coagulation sanguine.

Cependant, il semble probable qu'il existe un seuil du nombre de facteur tTF lié au facteur X à partir duquel la cascade de coagulation sera initiée. Cette approche semble intéressante seulement si le sang dans la majorité des vaisseaux est coagulé. En effet, on n'assiste à l'apparition d'effets anti-tumoraux que lorsqu'un nombre assez important de cellules tumorales sera privé de nutriments.

La recherche dans ce secteur de thérapie par coagulo-ligand est encore à ses débuts, il serait important pour son futur de définir des cibles appropriées au niveau de l'endothélium tumoral humain [63].

#### ***1.4.1.5.2 Les stratégies ciblant les cellules endothéliales tumorales :***

La majorité des approches thérapeutiques ont pour but de cibler les molécules effectrices des cellules tumorales, ce qui augmente l'efficacité et diminue la toxicité par ailleurs dans le corps.

Cependant, le traitement des tumeurs solides a été sans succès, ce qui laisse à croire que les drogues ciblées ont une faible pénétration dans les tumeurs solides.

Dans ce contexte, les cellules endothéliales tumorales sont actuellement considérées comme le meilleur candidat ciblé pour la thérapie cancéreuse.

De plus, les centaines de cellules tumorales dépendent du fonctionnement d'un seul vaisseau sanguin formé par quelques cellules endothéliales. Le nombre des cellules nécessaires à détruire est donc significativement moindre que lorsque les cellules tumorales elles-mêmes sont ciblées.

Plusieurs étapes majeures ont suivi, permettant le développement de nouvelles approches ayant pour but de détruire sélectivement les cellules endothéliales tumorales, notamment celle utilisant l'immunotoxine développée par Frankel et al. [64].

#### ***1.4.1.5.3 Quête de nouvelles cibles au niveau de l'endothélium tumoral :***

Le phénotype angiogénique de la vascularisation tumorale apporte les marqueurs les plus proéminents pour la différenciation entre les cellules endothéliales normales et celles tumorales.

L'une des premières études s'intéressant au développement de molécules reconnaissant spécifiquement l'endothélium tumoral a été publiée en 1986 par Hagemeyer et al. [65]. Cette équipe a développé un anticorps reconnaissant un antigène de 30kDa présent au niveau du point de bourgeonnement capillaire dans les tissus prolifératifs ainsi qu'au niveau des réactions inflammatoires aiguës et tumorales. Cette étude a été suivie par plusieurs autres, toutes décrivant des marqueurs moléculaires plus ou moins sélectivement exprimés au niveau des cellules endothéliales tumorales.

Récemment, plusieurs cibles ont été développées, à savoir l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  ainsi que le récepteur VEGFR. Cependant, au niveau des tumeurs humaines, la vascularisation existe à des différents stades d'activation ; en effet, à certains endroits, l'endothélium peut être à l'état quiescent, alors que dans d'autre, on assiste à la maturation de néovaisseaux. Donc l'utilisation de molécules dirigées contre un seul épitope, ne serait pas efficace pour bloquer une grande partie du flux sanguin tumoral [63].

#### **1.4.2 Mécanismes potentiels d'acquisition aux drogues anti-angiogéniques :**

Bien que la cible de la thérapie anti-angiogénique soit la cellule endothéliale normale et donc génétiquement stable et l'acquisition de résistance n'a pas été clairement démontrée au cours des études précliniques ni au cours de traitement de certaines tumeurs malignes, récemment une perte graduelle de l'activité anti-angiogénique apparaît évidente surtout quand ces drogues sont utilisées en monothérapie.

Les mécanismes potentiels permettant l'acquisition de résistance aux inhibiteurs angiogéniques sont :

- la surabondance de cellules tumorales sécrétant des facteurs de croissance vasculaires,
- les propriétés anti-apoptotiques/prosurvie des cellules endothéliales activées,
- les changements génétiques transitoires des cellules endothéliales,
- la dépendance vasculaire hétérogène des cellules tumorales
- et les altérations génétiques tels que l'inactivation du p53, les changements au niveau du HIF-1 $\alpha$  ou des voies de survie [52].

Enfin, les inhibiteurs de l'angiogenèse sont des drogues cytostatiques qui, pour être utilisées de façon rationnelle, nécessitent une évaluation clinique adéquate ainsi que le développement de biomarqueurs jouant le rôle de substituts pour leurs activités biologiques. Il est aussi important que ces agents atteignent les cellules endothéliales cibles ainsi que leur microenvironnement avec une concentration adéquate.

### 1.4.2.1 Le projet :

### 1.4.3 Hypothèse :

De nombreuses données cliniques et expérimentales suggèrent que la croissance tumorale et le processus métastatique dans son ensemble soient grandement influencés par les interactions entre les cellules tumorales et le microenvironnement de l'organe hôte, en particulier les cellules endothéliales de nouveaux vaisseaux sanguins composant le stroma de la tumeur. La formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins, ou angiogenèse, soutient la croissance tumorale en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'expansion des néoplasmes (effet de perfusion), en éliminant les déchets métaboliques et en produisant différentes cytokines et facteurs de croissance qui stimulent directement la croissance des cellules cancéreuses (effet paracrine).

L'angiogenèse tumorale peut donc apparaître comme une cible de choix dans le développement des thérapies anticancéreuses. Cette démarche présente des avantages. D'abord, on vise le contrôle de croissance de cellules normales et non tumorales. L'hypervariabilité de ces dernières leur permet de maîtriser le développement de résistances aux thérapies, ce qui ne devrait pas être le cas des cellules endothéliales mobilisées pour la vascularisation. De plus, l'angiogenèse étant essentiellement de même nature pour la plupart des tumeurs, une thérapie anti-angiogénique pourrait être efficace contre un large spectre de cancers. Enfin, l'angiogenèse étant peu active dans les processus normaux chez l'adulte sain, il devrait y avoir peu d'effets secondaires [27].

L'inhibition de cette néovascularisation par des composés perturbant certaines étapes moléculaires et cellulaires associées au développement des nouveaux vaisseaux est actuellement à l'étude dans plusieurs essais cliniques, et pourrait permettre le développement de traitements contrôlant la progression de métastases.

#### 1.4.4 Objectif :

La croissance des néo-vaisseaux peut être reproduite sur différents modèles expérimentaux afin d'étudier les fondements de ce processus et éventuellement de tester des produits anti-angiogéniques. La principale limite est cependant représentée par la quantification du phénomène afin de refléter la modification géométrique du réseau vasculaire de base.

L'objectif du travail proposé consiste à développer un modèle expérimental nous permettant de tester des substances inhibitrices de l'angiogenèse.

En effet, le test sur anneaux d'aorte de rat a été mis au point dans le but de nous permettre de tester :

- le 2 méthoxy-œstradiol en tant que produit de référence pour vérifier l'efficacité de la technique,
- le paclitaxel connu pour avoir des propriétés à la fois anticancéreuses et anti-angiogéniques,
- l'acide rétinoïque sous forme libre et encapsulée afin d'évaluer l'apport de l'encapsulation.

Les anneaux d'aorte de rat sont mis en culture avec la solution du produit à tester entre deux couches de collagène. Après un temps d'incubation approprié, les cultures sont suivies et des photos sont prises tous les 3 jours afin de quantifier l'angiogenèse et le taux d'inhibition.

La quantification se fait après une numérisation et binarisation des photos prises et un calcul de densité des vaisseaux.

#### 1.4.5 Méthode choisie :

Plusieurs modèles in vitro ainsi qu'in vivo ont été développés dans le but d'évaluer les effets des agonistes et des antagonistes angiogéniques et d'étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires.

Les tests *in vivo* sont considérés comme ceux permettant une meilleure évaluation des facteurs influençant l'angiogenèse, mais peuvent cependant se compliquer par des réactions inflammatoires entraînant la libération des cytokines angiogéniques à partir des cellules inflammatoires. D'autre part, les modèles *in vitro*, sur cellules endothéliales isolées, sont limités par le fait que la majorité des facteurs angiogéniques stimulent la mobilité et la prolifération des cellules sans induire de bourgeonnement, ni branchement ou formation tubulaire. Ces systèmes représentent seulement une reconstitution partielle du mur vasculaire et des interactions paracrines entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires comme les cellules musculaires lisses ou les fibroblastes.

Faisant le pont entre les modèles *in vitro* et ceux *in vivo*, le test sur anneau d'aorte de rat [9], utilisant des implants vasculaires intacts, reproduit plus exactement l'environnement dans lequel l'angiogenèse prend place. La quantification dans ce modèle se fait par digitalisation des photos, celle-ci permet le calcul de la densité des vaisseaux par rapport à la totalité de la surface, ainsi que l'appréciation de la longueur des vaisseaux à partir de l'anneau mis en culture [66].

La facilité de mise en pratique de ce test, ainsi que la disponibilité du matériel nécessaire à la culture des vaisseaux et leur quantification justifient son choix pour étudier l'angiogenèse et évaluer les substances anti-angiogéniques que nous voulions tester.

## 2 Matériel et méthodes :

### 2.1 Matériels et produits utilisés :

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sans calcium, magnésium et rouge de phénol, de Gibco.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) sans pyruvate, avec 4500 mg/l de glucose et pyroxidine HCl, de Sigma.

HAM F12 (Nutrient Mixture Ham's F-12) avec L-glutamine, de Gibco.

Fetal bovine serum (Sérum de Veau Fœtal)

Pénicilline/Streptomycine (10000U/ml), de Gibco.

Fungizone,

ECGs (Endothelial Cell Growth Supplement) from bovine pituitary, de Sigma.

EGF (Endothelial Growth Factor), de Sigma.

Insuline (100U/ml) – Lilly Humilin

Milieu minimum (à conserver à 4°C) :

- DMEM : 32.5 ml
- HAM F-12 : 11 ml
- SVF 10% : 5 ml
- Pénicilline-Streptomycine (100U/ml) : 500µl
- Fungizone : 50µl

Milieu maximum (à conserver à 4°C) :

- DMEM: 32.5 ml
- HAM F-12: 11 ml

- SVF 10% : 5 ml
- Pénicilline-Streptomycine (100U/ml) : 500 $\mu$ l
- Fungizone : 50 $\mu$ l
- EGF: 500  $\mu$ l
- Insuline: 25  $\mu$ l
- ECGs: 250  $\mu$ l

Solution de collagène :

- 1.5 ml de milieu minimum
- 1.2 ml de collagène de rat (3mg/ml)
- 200  $\mu$ l de NaOH 0.1N.

Substances à tester :

- 2 méthoxy-oestradiol de Sigma
- Paclitaxel
- Acide rétinoïque de Sigma

## 2.2 Méthodes :

La méthode choisie est celle qui constitue un pont entre les modèles in vitro et ceux in vivo, développée initialement par Nicosia et Ottinetti en 1990 [9]. En effet, dans ce système, les anneaux d'aorte de rat sont mis en culture dans une matrice de collagène, donnant lieu ainsi au développement d'un réseau vasculaire.

## 2.2.1 Préparation du collagène :

### 2.2.1.1 Recueil des queues :

Le collagène est extrait à partir de tendons de queues de rats mâles (type Wistar) selon la méthode de Elsdale et Bard [67].

Les queues sont récupérées au fur et à mesure qu'il y a eu sacrifice de rats pour d'autres expériences au laboratoire, ces queues sont lavées et congelées jusqu'au moment de leur utilisation ; en effet, on ne procède à l'extraction du collagène que lorsqu'on a recueilli un nombre assez important de queues.

Avant de commencer, on procède à la stérilisation de tout le matériel nécessaire à l'autoclave afin d'éviter tout risque de contamination, on prépare également les solutions d'éthanol à 70% et d'acide acétique à 0,1%. Toutes les manipulations se font stérilement sous une hotte à flux laminaire.

### 2.2.1.2 Dissection et solubilisation des tendons :

Les queues sont lavées à l'eau savonneuse, rincées soigneusement puis trempées dans l'éthanol à 70% pendant 15 minutes. Après quoi, on commence la dissection, en coupant l'extrémité distale de la queue et en dégageant la peau. Puis, avec des pinces fines, on tire sur les tendons qu'on recueille dans une petite boîte de pétri contenant de l'eau stérile. Quand il n'est plus possible de tirer sur cette section, on la coupe, on met à nu une autre section s'étalant sur quelques centimètres et on recommence. On procède ainsi sur toute la longueur de la queue. Par la suite, on coupe les tendons en petits morceaux afin de faciliter leur solubilisation et on les place dans une solution d'acide acétique 0,1% (60ml d'acide acétique pour chaque gramme de tendons). Le choix du solvant est justifié par son aptitude à conserver l'intégrité de la molécule, en

particulier les télépeptides nécessaires au réarrangement des molécules en fibres.

Le mélange ainsi obtenu est placé sous agitation à 4°C pendant au minimum 48h. Il sera par la suite centrifugé à 10000 RPM pendant 1h30 (centrifugeuse Beckmann J2/21, Rotor JA 10) et le surnageant sera recueilli stérilement.

### 2.2.1.3 Dosage du collagène :

Le dosage est réalisé en utilisant le kit pour le dosage des protéines : Micro BCA Protein Reagent Kit de Pierce pour déterminer l'absorbance des échantillons dans le spectre visible. On effectue une courbe standard avec du BSA (Bovine Serum Albumine) (0, 1, 2, 4, 6, 8 et 10 µg/µl).

Chacun des 10µl des différents échantillons est mélangé avec 1ml d'eau et 1ml de réactif BCA (Biscinchonic Acid) puis le tout est placé dans un bain-marie à 37°C pendant 1h, au bout de laquelle apparaît une coloration violette dont l'absorbance est mesurée à 562nm.

À partir de la concentration de la solution stock, une dilution suffisante est réalisée pour obtenir une solution finale ayant une concentration de 3mg/ml

Le collagène est conservé à 4°C.

### 2.2.2 Préparation des puits :

La préparation des puits a lieu la veille de la manipulation. Il s'agit d'un pré-enduit fait par un mélange de milieu minimum, de solution de collagène (3mg/ml) et de solution de NaOH (0,1N). Ce mélange doit être réalisé extemporanément dans un tube stérile préalablement refroidi et la manipulation se fait dans un bain de glace.

Afin de recouvrir le fond des puits, on dépose 0,5 ml du mélange préparé dans chaque puits et on place la plaque dans l'incubateur à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3 Prélèvement du tissu :

Il se déroule en plusieurs étapes :

- on anesthésie le rat au pentobarbital sodique (0,1ml/100g de poids),
- une fois endormi, on le fixe à la planche de dissection,
- on désinfecte l'abdomen du rat,
- on ouvre la cavité abdominale sur la ligne médiane au-dessus du pénis jusqu'au foie,
- on dégage les intestins, qu'on recouvre d'une gaze imbibée de sérum physiologique, sur la droite de l'animal,
- on prépare 2 ligatures qu'on place sur l'aorte abdominale, l'une entre les deux artères mésentériques et l'autre le plus bas possible du côté des artères iliaques,
- on injecte une dose létale de pentobarbital dans la veine cave inférieure,
- et on procède rapidement à la dissection de l'aorte qu'on récupère dans une solution de HBSS.

### 2.2.4 Préparation des anneaux :

La préparation des anneaux se fait sous la loupe binoculaire. En effet, le tronçon d'aorte est placé dans une boîte de pétri en verre dont le fond a été recouvert de résine. Il sera fixé avec deux minuties afin de faciliter son nettoyage. Avec des pinces fines à micro-vaisseaux, on procède au nettoyage des tissus graisseux et des autres débris accolés à l'aorte. Par la suite, on déplace l'aorte délicatement dans le fond d'une boîte de pétri contenant de l'HBSS. On maintient l'extrémité de l'aorte à l'aide d'une pince et on élimine les deux bouts du tronçon puis on coupe des anneaux d'environ 1mm tout en tâchant à ne pas abîmer l'aorte.

### 2.2.5 Mise en culture :

La mise en culture est réalisée sous une hotte stérile. En effet, les anneaux sont placés dans le support pré-enduit de collagène (1 anneau/puits). Puis on prépare rapidement une solution de collagène à froid qu'on fait couler dans chaque puits (environ 0,5ml) afin de couvrir l'anneau. Par la suite on place le support dans l'incubateur à 37°C pendant environ 30 minutes, temps nécessaire à la solidification du collagène. Enfin, on ajoute le milieu de culture (milieu maximum), 500µl dans chaque puits, qu'on change à tous les 2 jours. Les plaques sont placées dans l'incubateur tout au long de l'expérience.

### 2.2.6 Produits antiangiogéniques à tester :

Selon la solubilité des molécules à tester, on a procédé différemment pour la préparation des solutions. En effet, le 2-méthoxy-oestradiol, le paclitaxel et l'acide rétinolique aussi bien libre qu'encapsulé sont peu solubles dans l'eau, on les a donc solubilisés dans l'éthanol absolu, obtenant ainsi des solutions-mères 100 fois plus concentrées qu'on a diluées au centième avec de l'eau distillée avant de les tester.

#### 2.2.6.1 Le 2 méthoxy-oestradiol (2ME) :

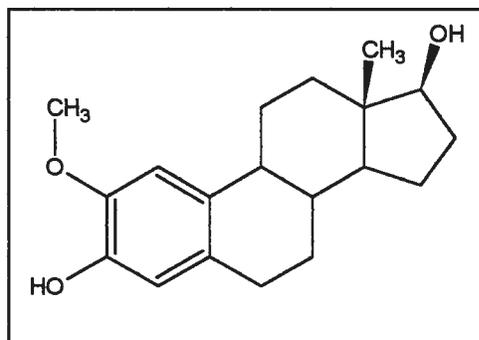


Figure 11 : Formule chimique du 2 méthoxy-oestradiol

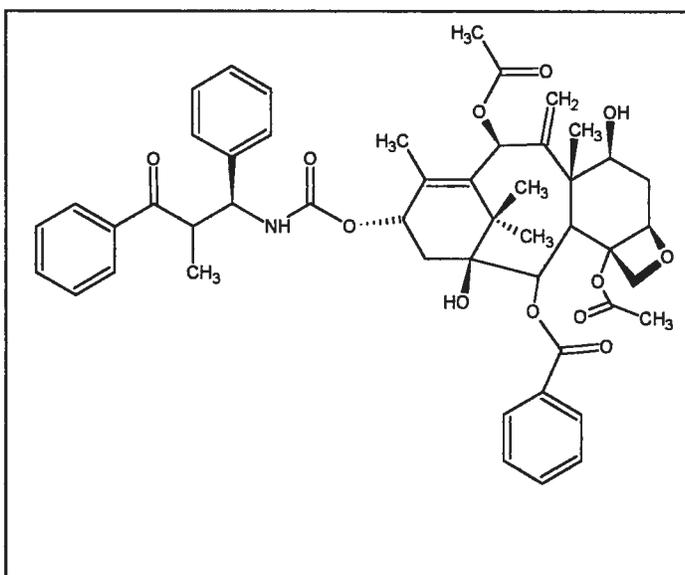
Il s'agit d'un métabolite naturel de l'œstradiol muni d'une activité antitumorale et antiangiogénique. Le 2ME est fabriqué par les cellules du granulosa ayant une activité cathécol-O-méthyl transférase, il est présent en haute concentration dans les follicules normaux [68].

Certaines études ont montré que cet oestrogène a un effet cytotoxique sur plusieurs cellules prolifératives *in vitro* [69-71] et supprime certaines tumeurs murines *in vivo* [72, 73].

Le 2ME est aussi bien connu pour être un inhibiteur de la dynamique des microtubules entraînant un arrêt mitotique suivi d'une apoptose. Le mécanisme exact par lequel le 2ME inhibe les cellules en prolifération est encore pratiquement inconnu.

L'un des mécanismes proposés pour expliquer l'activité cytotoxique du 2 ME est son interférence avec la stabilité tubulaire et l'arrêt qui s'en suit au niveau de la phase G2/M du cycle cellulaire [74].

#### 2.2.6.2 Le paclitaxel :



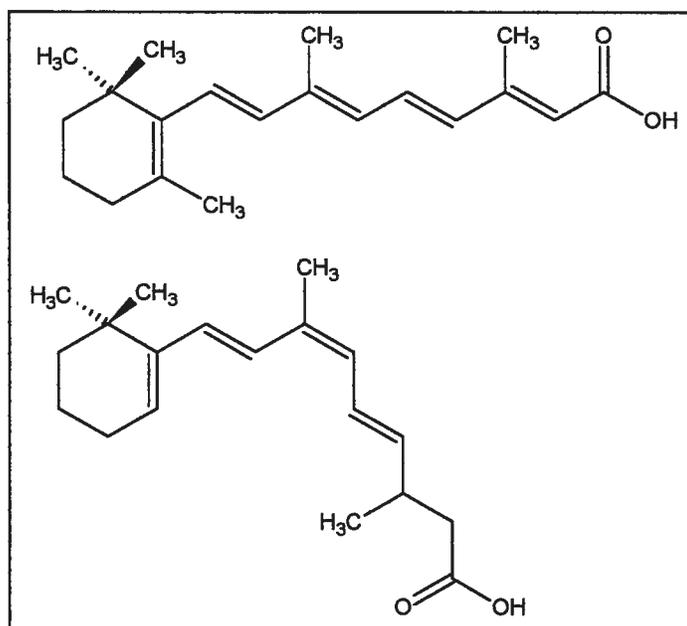
*Figure 12 : Formule chimique du paclitaxel*

Le paclitaxel est un taxoïde extrait de l'écorce de l'if du Pacifique. Il s'agit d'un produit anti-néoplasique ayant une activité stabilisatrice des microtubules, il est utilisé pour le traitement de plusieurs cancers (cancer de l'ovaire, du sein, certains cancers cutanés et pulmonaires...).

Récemment, il a été démontré que le paclitaxel présente une activité anti-vasculaire puisqu'il endommage sélectivement les cellules endothéliales de la vascularisation tumorale entraînant ainsi un blocage vasculaire et une nécrose tumorale importante.

Cette activité antiangiogénique est observée à des doses inférieures aux doses cytotoxiques, elle est apparemment attribuée aux effets du paclitaxel sur la mobilité des cellules endothéliales qui est inhibée dans des conditions où leur prolifération n'est pas modifiée [49].

### 2.2.6.3 L'acide rétinoïque :



*Figure 13 : Formules chimiques des acides rétinoïques tout trans et 9-cis*

L'acide rétinoïque est actuellement largement utilisé dans plusieurs essais cliniques. Il existe sous deux formes biologiquement actives : l'acide rétinoïque tout-trans et l'acide 9-cis-rétinoïque.

Ces molécules pénètrent dans le noyau, agissent sur des récepteurs de type RAR (retinoic acid receptor) et RXR (retinoic X receptor). Ces récepteurs activés se dimérisent, formant des homodimères ou des hétérodimères, se lient aux éléments de réponse de l'acide rétinoïque (ou RARE) et modulent la transcription de certains gènes. Ils modulent ainsi la synthèse de diverses protéines encore insuffisamment identifiées [75, 76].

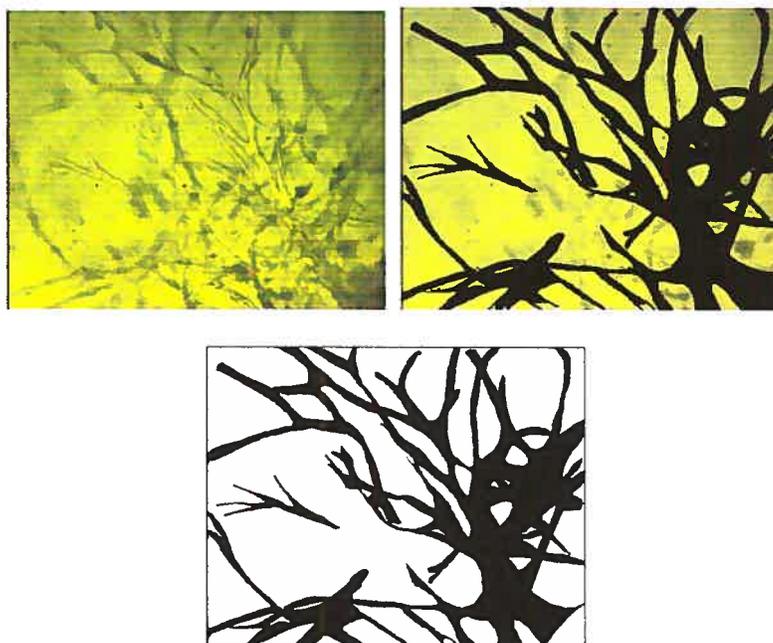
Par ailleurs les rétinoïdes inhibent le facteur AP-1 et réduisent ainsi la synthèse de métalloprotéases (par exemple les collagénases), ce qui explique leur activité antiangiogénique [77] [78].

Cependant, l'acide rétinoïque est sensible, il est facilement altéré par l'oxygène de l'air, la lumière et la chaleur.

### 2.2.7 Acquisition et analyse des images :

Après la mise en culture, les plaques sont observées au microscope chaque deux jours jusqu'à apparition de nouveaux tubes, à partir de ce moment, des photos sont prises à tous les quatre jours par ce même microscope muni d'une caméra. En effet, le début de croissance tubulaire a lieu quatre à huit jours après la mise en culture et ceci en fonction du poids du rat, plus le rat a un poids important, plus le déclenchement de la croissance tubulaire sera lent. Afin d'éviter tout risque d'erreur dû à l'hétérogénéité des rats, chaque culture présente des puits témoins fait dans les mêmes conditions et avec le même rat. Les photos sont prises à un agrandissement X40. Elles représentent divers endroits du puits afin d'apprécier la qualité du réseau tubulaire développé, mais seules les photos contenant un petit bout de l'anneau mis en culture ont été traitées pour être sûr que l'on soit toujours à même distance de l'anneau.

Les photos sélectionnées pour le traitement ont été traitées grâce au logiciel Paint Shop Pro®. Ce dernier nous a permis de binariser les photos. En effet, les nouveaux tubes sont transformés en noir et tout le reste en blanc y compris le bout de l'anneau mis en culture qui apparaît sur la photo (Fig n°14).



*Figure 14 : Les différentes étapes de traitement des photos*

Par la suite, on a utilisé le logiciel Optimas® pour pouvoir calculer la densité vasculaire. Ce logiciel nous permet d'obtenir la densité des nouveaux vaisseaux en pourcentage par rapport à la surface totale de l'image. La comparaison des résultats a été réalisée grâce au logiciel SigmaStat®. Étant donné que le nombre d'échantillons est réduit et que la distribution ne suit pas une loi normale, un test non paramétrique de rang (Mann-Withney) a été utilisé. Quand la normalité était respectée un test t de Student a été pratiqué. Les résultats ont alors été indiqués quand ils diffèrent du test de rang.

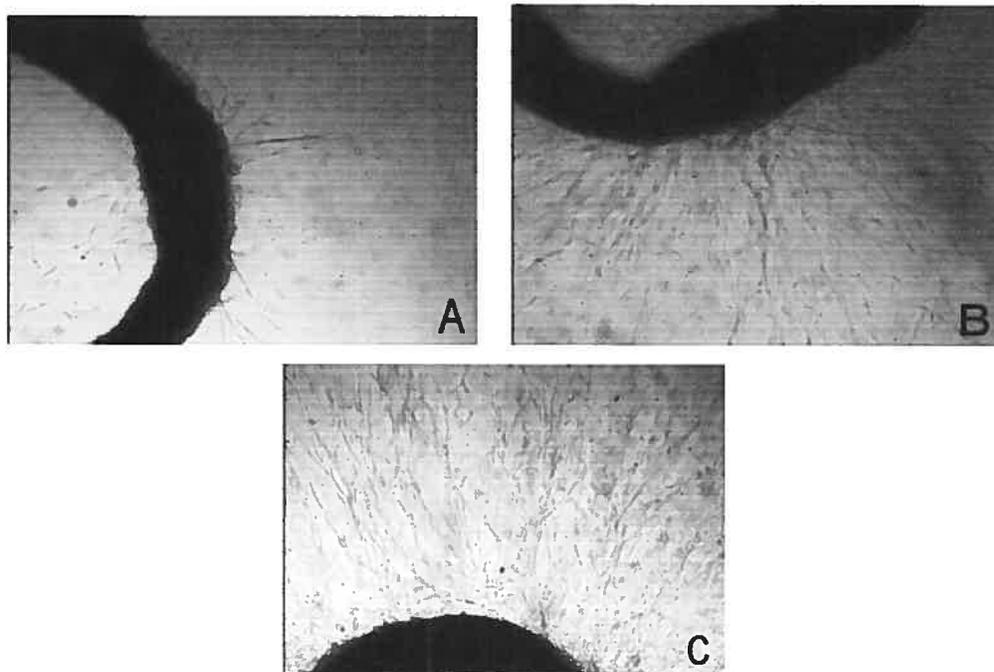
### 3 Résultats et discussion :

#### 3.1 Culture témoin :

Deux cultures témoins ont été pratiquées au début du projet afin de mettre au point la technique, elles ont été suivies tous les 4 jours, des photos ont été prises et quantifiées. La quantification consiste à calculer la densité vasculaire grâce au logiciel Optimas©, nous permettant d'obtenir le pourcentage de surface occupé par les néo-vaisseaux par rapport à la surface totale de la photo.

##### 3.1.1 Première culture :

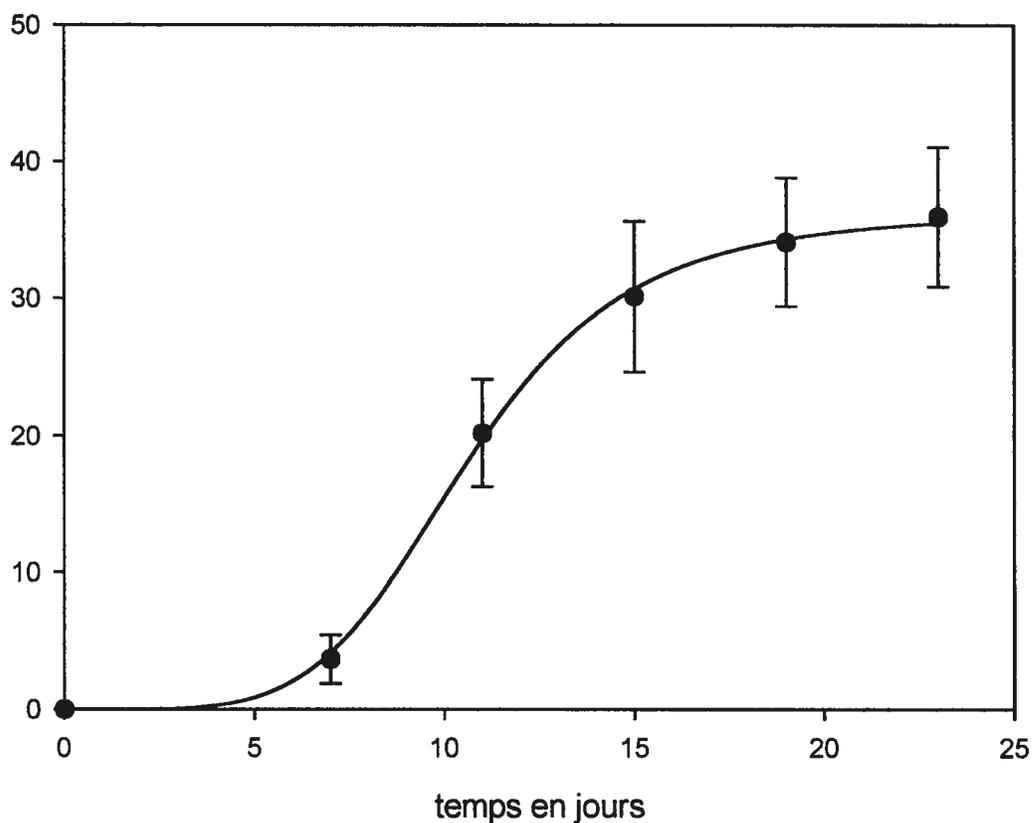
Elle a été pratiquée sur un rat Wistar mâle de 450 g.



*Figure 15 : Photos d'anneau en culture : A à J7, B à J11, C à J15*

Tableau I : Densité vasculaire en fonction du temps

Temps \ Densité	J7	J11	J15	J19	J23
Puits 1	3,1	21,5	30,7	35,9	37,3
Puits 2	2,5	17,8	25,3	30,1	33,4
Puits 3	4,3	24,3	33,2	37,2	37,8
Puits 4	2,7	14,1	22,5	28,7	30,3
Puits 5	0	0	0	0	0
Puits 6	1,4	15,8	21,9	25,8	26,5
Puits 7	7,5	26,2	36,1	38,3	40,2
Puits 8	3,4	20,5	32,7	36,1	37,9
Puits 9	2,9	18,9	33,1	35,8	37,1
Puits 10	5,1	22,6	35,7	39,2	43,1
Moyenne	3,3	18,2	27,1	30,7	32,2



*Figure 16 : Courbe représentant la croissance vasculaire en fonction du temps*

On note que la variation de la densité vasculaire en fonction du temps suit une fonction croissante, en effet, on assiste à un développement vasculaire rapide pendant les deux premières semaines qui suivent la mise en culture de l'anneau pour atteindre un plateau à partir du 20<sup>ème</sup> jour. Une fonction logistique obtenue par régression non linéaire décrit correctement la courbe :

$$y = \frac{36,77}{1 + \frac{t^{-4,933}}{10,62}} \text{ avec un } R^2 \text{ de } 0,9230. \text{ En fait, la fonction de}$$

régression utilisée par Sigmaplot est log-logistique. Il serait aisé en faisant un changement de variable de passer d'une fonction logistique traditionnelle à celle utilisée pour le *fitting*. Néanmoins cette démonstration mathématique n'est pas justifiable dans ce projet puisqu'en aucun cas le résultat du *fitting* ne doit être pris comme une modélisation exacte et que le propos du travail est autre.

L'équation est de la forme :

$$y = \frac{k}{1 + \left( \frac{t}{y_0 / (k - y_0)^r} \right)^{-r}}$$

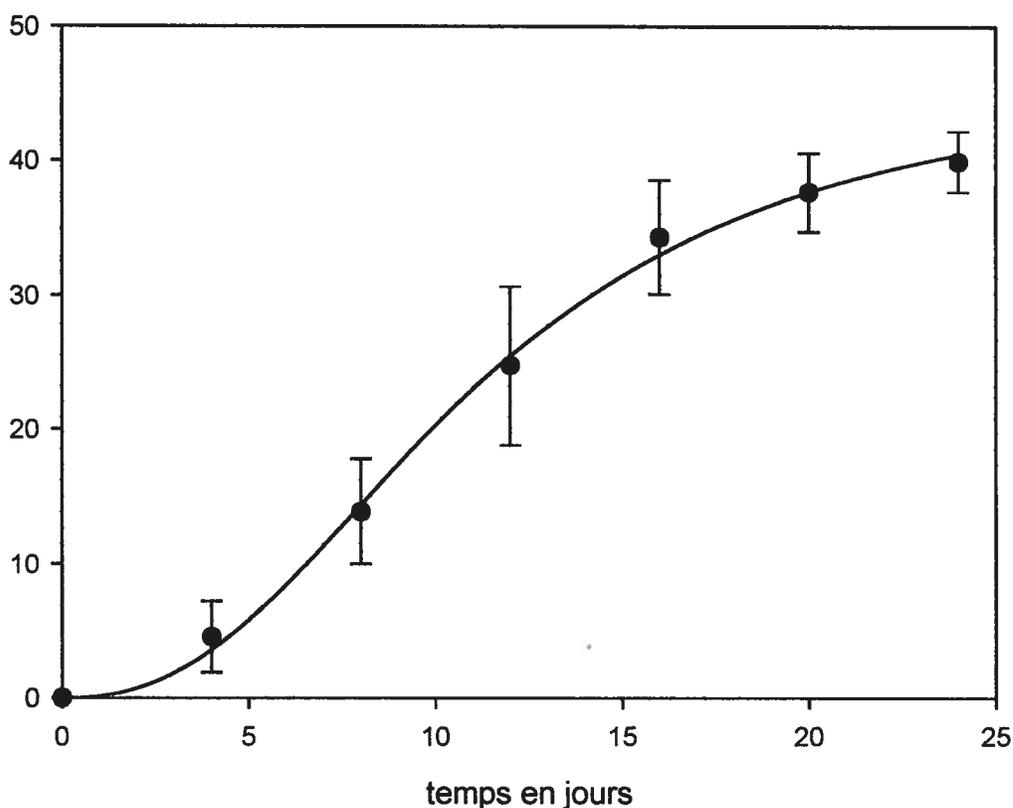
$y_0$  représente la valeur de départ ; elle vaut avec les paramètres de *fitting*  $3,1887 \cdot 10^{-4}$ . Comme on peut s'y attendre, elle tend vers zéro. En effet, il n'y a pas en principe de croissance qui a eu lieu au temps zéro. La valeur de  $k$  est la valeur asymptotique quand  $t$  augmente ; cela représente concrètement le plateau de croissance. Cette valeur intéressante est de 36,77 dans ce cas.

### 3.1.2 Deuxième culture :

Elle a été pratiquée sur des anneaux d'aorte d'un rat Wistar mâle de 300 g.

Tableau II : Densité vasculaire en fonction du temps

Temps \ Densité	J4	J8	J12	J16	J20	J24
Puits 1	3,5	12,1	25,1	34,8	36,1	40,3
Puits 2	5,2	15,4	25,9	33,9	38,4	39,9
Puits 3	2,9	13,2	26,3	35,1	39,3	41,1
Puits 4	4,3	14,9	25,4	37,3	37,5	39,1
Puits 5	3,9	15,2	23,1	35,2	38,6	42,7
Puits 6	4,7	16,4	22,7	33,9	37,2	39,4
Puits 7	11,3	21,4	37,7	41,7	42,9	42,9
Puits 8	3,2	11,9	23,8	30,7	35,1	37,3
Puits 9	5,1	12,3	24,2	35,1	39,3	40,9
Puits 10	1,2	6,2	13,1	25,3	31,9	35,5
Moyenne	4,5	13,9	24,7	34,3	37,6	39,9



*Figure 17 : Courbe représentant la croissance vasculaire en fonction du temps*

Les résultats de cette deuxième expérience rejoignent ceux de la première, mais il existe une petite différence au niveau du délai d'apparition des premiers néo-vaisseaux qui se fait 4 jours après la mise en culture pour cette expérience alors que pour la première, il a fallu attendre 7 jours pour voir apparaître de nouveaux vaisseaux. L'équation logistique de régression qui décrit la courbe

est de la forme :  $y = \frac{46,68}{1 + \frac{t^{-2,438}}{11,15}}$  avec un  $R^2$  de 0,8902. On notera que la

surface maximale occupée par le réseau vasculaire en croissance est supérieure au cas précédent.

### 3.1.3 Conclusion :

Ces deux cultures nous ont permis de mettre au point la technique, et de s'assurer de sa faisabilité avec le matériel disponible dans notre laboratoire.

On a également pu conclure que :

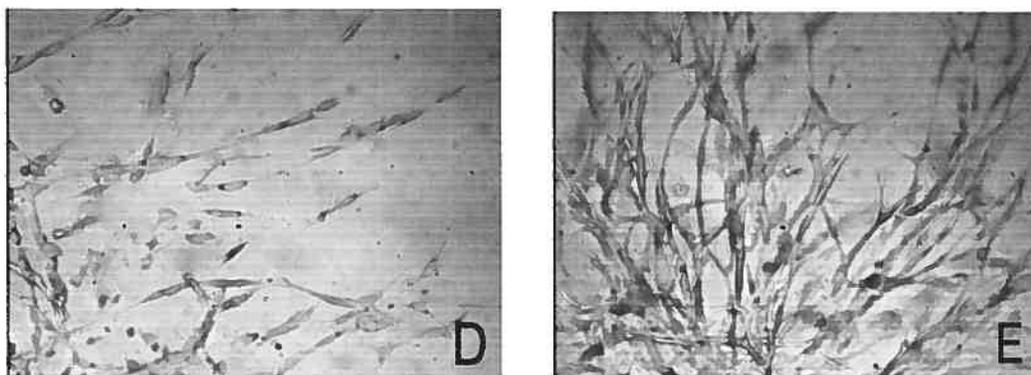
- La croissance vasculaire en fonction du temps suit une fonction logistique qui débute pendant la 1<sup>ère</sup> semaine suivant la mise en culture pour atteindre un plateau au-delà de la 3<sup>ème</sup> semaine, ce qui rejoint les résultats de Janet Stiffey-Wilusz et al. qui ont montré au cours d'une étude faite sur l'artère carotidienne porcine que l'apparition des nouveaux vaisseaux a lieu à partir du 8<sup>ème</sup> jour pour atteindre un plateau à partir du 16<sup>ème</sup> jour[79], de même; l'étude de Wen-Hui Zhu et al. montre que la croissance des microvaisseaux à partir de l'aorte de souris débute à J4 pour devenir stationnaire à partir de J10[80].

- Le délai d'apparition de nouveaux vaisseaux dépend de la corpulence du rat, en effet, on a noté que plus le rat est gras, plus ce délai augmente. Ce délai pourrait aussi être expliqué par le fait que les rats les plus gras sont ceux qu'on a gardés plus longtemps au laboratoire et ils étaient probablement les plus âgés ; cette constatation rejoint celle de Wen-Hui Zhu et al. qui ont noté que la réponse angiogénique des anneaux d'aorte de souris est significativement influencée par l'âge de l'animal, plus l'animal est vieux, plus le développement de néo-vaisseaux est retardé [80]. On peut noter que la valeur de la surface occupée au plateau semble également lié à l'âge ou la corpulence des rats.

Dans un travail futur, des études de modélisation plus approfondies seraient intéressantes

### 3.2 Appréciation de l'erreur due à l'expérimentateur :

La quantification de la densité vasculaire nécessite au préalable un traitement manuel des photos permettant leur binarisation, ce qui est complètement dépendant de l'appréciation de l'expérimentateur. Afin d'évaluer l'erreur qui pourrait en découler, on a décidé de pratiquer une expérience qui consiste à prendre deux photos de culture vasculaire (Photos D et E), qu'on a traité à plusieurs reprises : une première fois, puis 3 jours et enfin 15 jours après le premier traitement; et à chaque fois on a procédé à la binarisation des photos à 2 moments différents : matin et soir. Les résultats sont rapportés dans le tableau suivant. L'erreur relative est calculée en rapportant l'écart type à la densité moyenne.



*Figure 18 : Photos d'un réseau vasculaire D à J5 et E à J20*

On a choisit 2 photos différentes : la première contient très peu de nouveaux vaisseaux alors que la seconde présente un réseau vasculaire bien développé, ceci nous a permis de constater que l'erreur relative varie de 1 à 3%. Ce qui est

justifiable puisque quand il s'agit de traiter une photo contenant quelques néovaisseaux, le moindre dépassement fera une différence notable, alors que dans le cas contraire, un débordement ne constituera pas une grande erreur relative. Cependant, une erreur relative allant de 1 à 3% reste une erreur négligeable et ne risque pas de faire des changements au moment de l'interprétation des résultats des expériences qui vont suivre.

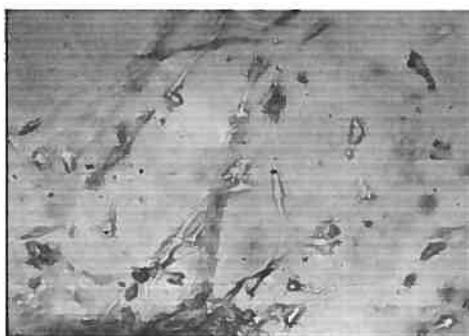
Tableau III : Densité de la vascularisation en fonction du moment d'analyse

	<b>Photo D</b>	<b>Photo E</b>
<b>1<sup>er</sup> jour matin</b>	5,6	58,9
<b>1<sup>er</sup> jour soir</b>	5,3	58,5
<b>3<sup>ème</sup> jour matin</b>	5,8	60,0
<b>3<sup>ème</sup> jour soir</b>	5,7	59,3
<b>15<sup>ème</sup> jour matin</b>	5,6	58,5
<b>15<sup>ème</sup> jour soir</b>	5,7	59,2
<b>Moyenne</b>	5,6	59,1
<b>Ecart type</b>	0,17	0,57
<b>Erreur en pourcentage</b>	3%	1%

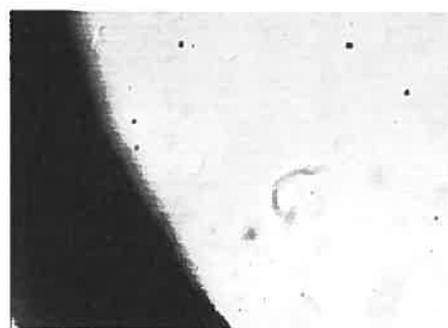
### 3.3 Culture en présence du 2 méthoxy-oestradiol :



*Culture témoin*



*Culture en présence du 2ME  
( $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ )*



*Culture en présence du 2ME  
( $4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ )*

*Figure 19 : Photos des différentes cultures en présence du 2 ME à J21*

Tableau IV : Densité vasculaire des cultures en présence du 2ME

J21	Culture témoin	En présence du 2 ME ( $2 \cdot 10^{-6}$ mol/L)	En présence du 2 ME ( $4 \cdot 10^{-6}$ mol/L)
Puits 1	16,7	6,2	0
Puits 2	54,8	0	0
Puits 3	40,9	0	0
Puits 4	13,6	0	0
Puits 5	15	0	0
Médiane	16,7	0	0
Moyenne	28,2	1,2	0
Ecart type	18,6	2,7	0
Pourcentage d'inhibition	0%	95%	100%

La présence du 2-méthoxy-œstradiol a entraîné une inhibition importante de la néoangiogenèse. En effet, on a une inhibition de 95% pour une concentration de  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L et de 100% pour une concentration de  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Cette inhibition est statistiquement significative pour les deux concentrations comparées à la culture témoin :  $p=0,008$  pour 2ME ( $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L) et  $p=0,008$  pour 2ME ( $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L); cependant la différence entre les deux concentrations utilisées n'est pas statistiquement significative :  $p=0,690$ .

Ces résultats confirment les résultats déjà publiés et appuient l'hypothèse que le 2ME pourrait être utilisé en tant que produit anti-angiogénique.

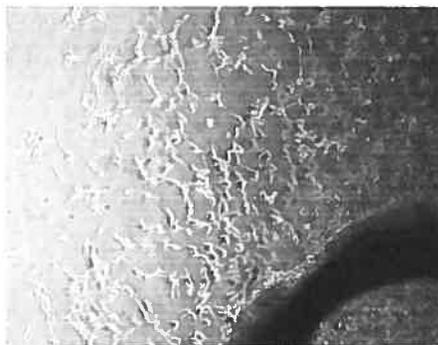
Helena Pavlakovic et al. dans leur étude sur le rhabdomyosarcome embryonnaire humain, ont montré que le 2ME entraîne une inhibition dose dépendante de la prolifération des cellules endothéliales : à une dose de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  mol/L, l'inhibition est de 20%, à une dose de  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L, elle est de 60% et à  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L, elle est de 80% [18].

L'étude de Fotsis et al. montre que le 2ME est un inhibiteur potentiel de l'angiogenèse et de la croissance tumorale et que son aptitude à supprimer la tumorigenèse est due à son action inhibitrice de la prolifération des cellules endothéliales [81].

### 3.4 Culture en présence du paclitaxel :

#### 3.4.1 Culture à J7 :

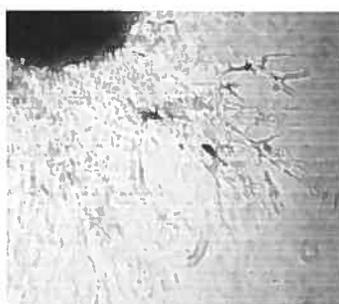
Sept jours après la mise en culture, on a remarqué que la présence du paclitaxel a entraîné une inhibition dose dépendante de la néoangiogénèse atteignant les 96 %. En effet, en utilisant des concentrations de l'ordre de  $10 \cdot 10^{-9}$  mol/L, on n'a pas noté de différence avec le groupe témoin, le pourcentage d'inhibition est de 0% ( $p=0,937$ ). A des doses de  $100 \cdot 10^{-9}$  mol/L, le pourcentage d'inhibition est de 32% ( $p=0,093$ ). Enfin, à des doses plus importantes de l'ordre de  $1000 \cdot 10^{-9}$  mol/L le pourcentage d'inhibition atteint 96% avec une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin ( $p=0,026$ ).



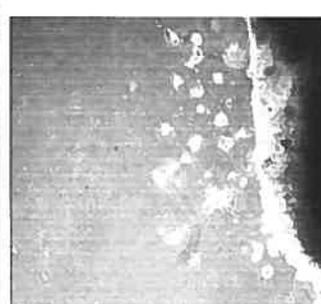
*Culture témoin*



*Paclitaxel  
10.10<sup>-9</sup> mol/L*



*Paclitaxel  
100.10<sup>-9</sup> mol/L*



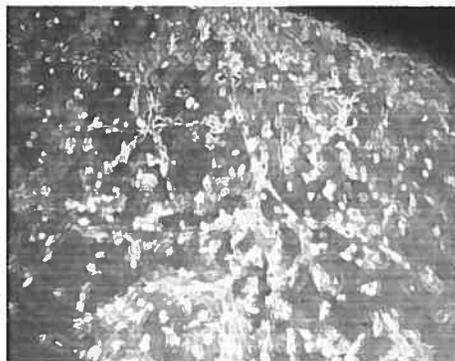
*Paclitaxel  
1000.10<sup>-9</sup> mol/L*

*Figure 20 : Photos des différentes cultures en présence du paclitaxel  
à J7*

Tableau V : Densité vasculaire des cultures en présence paclitaxel à J7

J7	Culture témoin	En présence du paclitaxel $10.10^{-9}$ mol/L	En présence du paclitaxel $100.10^{-9}$ mol/L	En présence du paclitaxel $1000.10^{-9}$ mol/L
Puits 1	37,2	41,2	38,8	7,1
Puits 2	57,2	39,3	33,6	0
Puits 3	61,2	51,3	32,2	0
Puits 4	50,2	49,7	42,3	0
Puits 5	49,5	52,3	26,5	0
Puits 6	0	43,5	0	2,6
Médiane	49,9	46,6	32,9	0
Moyenne	42,6	46,2	28,9	1,6
Ecart type	22,4	5,6	15,2	2,8
Pourcentage d'inhibition	0%	0%	32%	96%

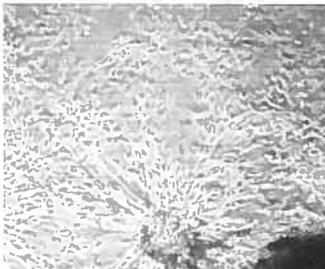
### 3.4.2 Culture à J15 :



*Culture témoin*



*Paclitaxel  
10.10<sup>-9</sup> mol/L*



*Paclitaxel  
100.10<sup>-9</sup> mol/L*



*Paclitaxel  
1000.10<sup>-9</sup> mol/L*

*Figure 21 : Photos des différentes cultures en présence du  
Paclitaxel à J15*

Tableau VI : Densité vasculaire des cultures en présence du paclitaxel à J15

J15	Culture témoin	En présence du paclitaxel $10.10^{-9}$ mol /L	En présence du paclitaxel $100.10^{-9}$ mol/L	En présence du paclitaxel $1000.10^{-9}$ mol/L
Puits 1	45,1	42,3	42,0	7,5
Puits 2	57,1	45,1	31,6	0
Puits 3	63,2	56,1	33,6	0
Puits 4	51,2	49,5	43,5	0
Puits 5	45,9	58,7	45,7	0
Puits 6	29,8	48,7	0	3,2
Médiane	48,6	49,1	37,8	0
Moyenne	48,7	50,1	32,7	1,8
Ecart type	11,5	6,3	17	3,1
Pourcentage d'inhibition	0%	0%	32%	96%

Quinze jours après la mise en culture on n'a noté qu'une légère augmentation de la moyenne pour les anneaux ayant reçu une concentration de  $100.10^{-9}$  mol/L avec un pourcentage d'inhibition qui est resté inchangé pour les différentes concentrations.

Ces résultats rejoignent ceux qui ont déjà été publiés. En effet, l'étude de Belotti et al. montre que l'activité antiangiogénique du paclitaxel est attribuée à son action au niveau de la mobilité des cellules endothéliales plutôt qu'au

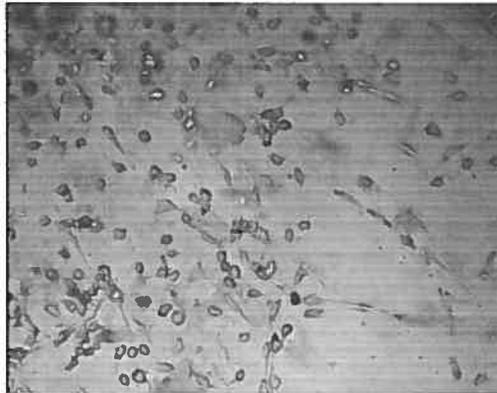
niveau de la prolifération cellulaire : le paclitaxel inhibe la mobilité cellulaire dans des conditions où la prolifération n'est pas modifiée, c'est-à-dire à faible dose faible et à courte durée d'exposition [82].

De plus, l'étude de Lau D.H. et al. faite sur un modèle de cancer du sein métastatique montre que le paclitaxel est doté d'une activité anti-angiogénique indépendante de son action anti-proliférative ; en effet, l'étude montre une diminution de l'index de tortuosité intra-tumorale de microcirculation ainsi qu'une réduction dose dépendante de la densité vasculaire intra-tumorale [83].

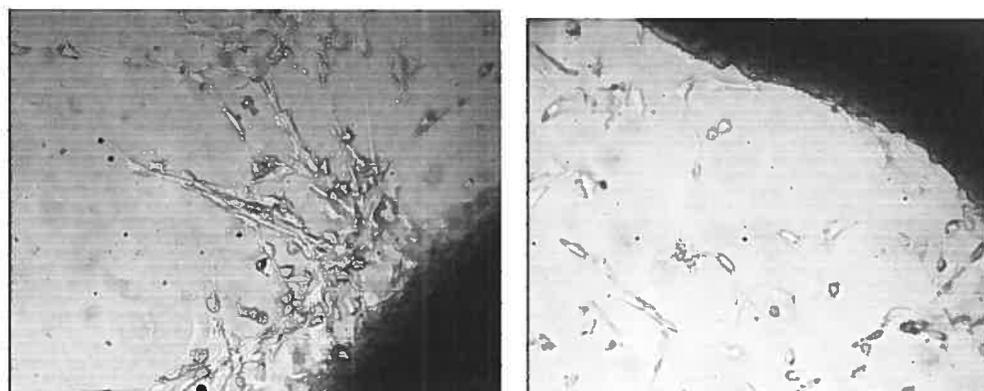
### 3.5 Culture en présence d'acide rétinoïque libre et encapsulé :

#### 3.5.1 Acide rétinoïque libre :

##### 3.5.1.1 Culture à J7 :



*Culture témoin*



*AR libre  $10^{-6}$  mol/L*

*AR libre  $10^{-4}$  mol/L*

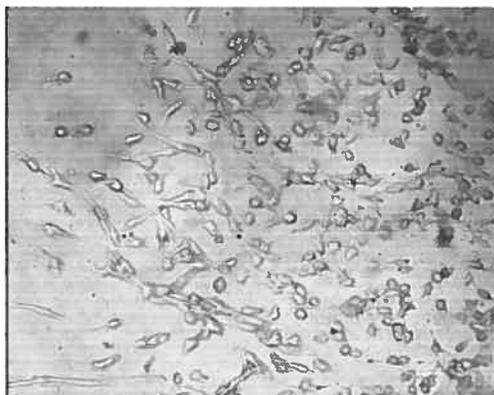
*Figure 22 : Photos des différentes cultures en présence d'AR libre à J7*

La culture des tissus en présence de l'acide rétinoïque nous a montré l'effet antiangiogénique de cette molécule à des doses de  $10^{-6}$  mol/L avec un pourcentage d'inhibition de 62% avec une différence statistiquement significative par rapport à la culture témoin ( $p=0,004$ ). On n'a pas noté de différence lors de l'utilisation de concentrations plus importantes de l'ordre de  $10^{-4}$  mol/L (voir tableau VII).

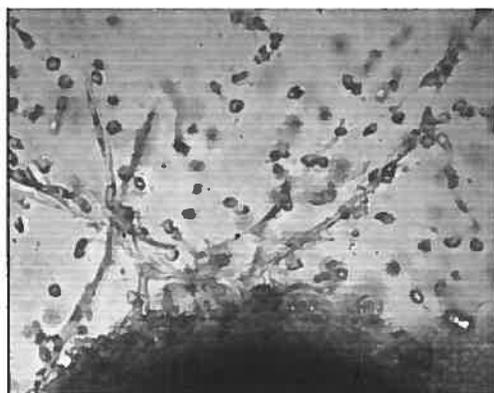
Tableau VII : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR libre à J7

J7	Culture témoin	En présence d'AR libre $10^{-6}$ mol/L	En présence d'AR libre $10^{-4}$ mol/L
Puits 1	11,2	8,7	3,7
Puits 2	8,5	2,8	8,6
Puits 3	8,9	6,2	1,3
Puits 4	13,6	0	0
Puits 5	12,8	3,7	5,1
Puits 6	15,3	5,1	6,6
Médiane	12	4,4	4,4
Moyenne	11,7	4,4	4,2
Ecart type	2,7	2,9	3,2
Pourcentage d'inhibition	0%	62%	64%

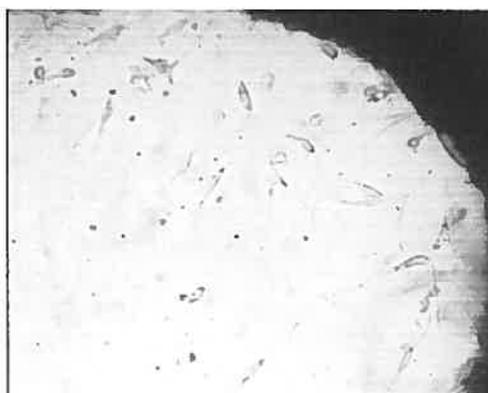
### 3.5.1.2 Culture à J15 :



*Culture témoin*



*AR libre 10<sup>-6</sup> mol/L*



*AR libre 10<sup>-4</sup> mol/L*

*Figure 23 : Photos des différentes cultures en présence d'AR libre à J15*

Tableau VIII : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR libre à J15

J15	Culture témoin	Acide rétinoïque libre $10^{-6}$ mol/L	Acide rétinoïque libre $10^{-4}$ mol/L
Puits 1	41,2	16,9	7,8
Puits 2	35,4	8,7	17,2
Puits 3	28,2	10,3	9,1
Puits 4	47,5	6,6	6,7
Puits 5	22,4	12,3	12,7
Puits 6	30,7	15,2	13
Médiane	33,1	11,3	10,9
Moyenne	34,2	11,7	11,1
Ecart type	9,1	3,9	3,9
Pourcentage d'inhibition	0%	65%	67%

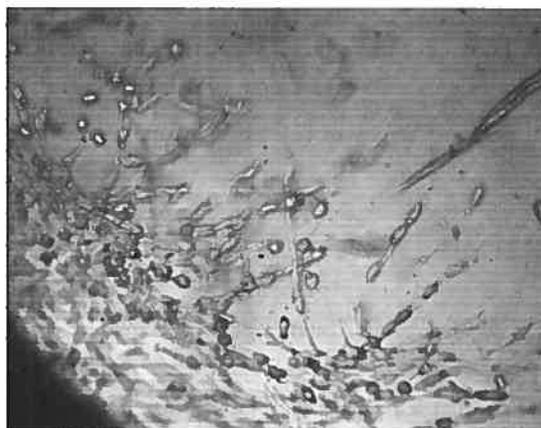
Quinze jours après la mise en culture, on n'a pas noté de modification importante, en effet, le pourcentage d'inhibition est passé de 62% à 65% pour la concentration de  $10^{-6}$  mol/L et de 64% à 67% pour  $10^{-4}$  mol/L avec une différence toujours significative par rapport au témoin ( $p=0,002$ ). Cependant la différence entre les groupes ayant reçu des concentrations différentes, n'est pas statistiquement significative.

En effet, ces résultats rejoignent ceux constatés par Soumitro Pal et al. qui ont noté au cours d'une expérience sur le modèle de CAM modifié que l'acide rétinoïque tout trans inhibe le développement normal des vaisseaux sanguins, cette inhibition atteint les 50% pour une concentration de  $10 \cdot 10^{-6}$  mol/L [78]. De plus, l'étude de Lingen et al. a montré que l'administration systémique d'acide rétinoïque à une dose de 1mg/kg/jour inhibe l'angiogenèse induite par un stroma tumoral conditionné sur un modèle de cornée de souris [84]. Par ailleurs, l'étude de Barbara Vega Diaz et al. utilisant des kératinocytes normales humaines dans des cultures conventionnelles ainsi que des souris nude ayant une greffe de peau in vivo, ont montré que les rétinoïdes peuvent inhiber l'induction du gène VEGF au niveau de la transcription et de ce fait inhibent l'angiogenèse [85].

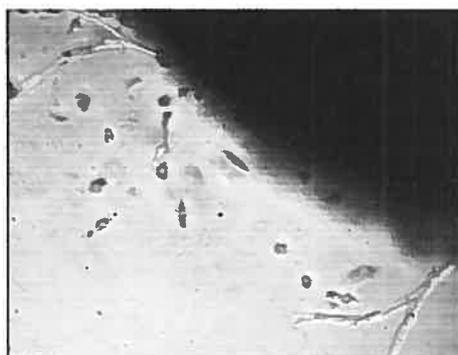
Cependant, les études portant sur l'acide rétinoïque présentent plusieurs controverses. En effet, l'étude de Toshitaka Maeno et al. montre que l'utilisation de l'acide rétinoïque tout trans accroît significativement la production du VEGF [86]. De plus, l'étude de Carlo Gaetano montre que l'acide rétinoïque tout trans stimule la sécrétion de FGF-2 et qu'il augmente la prolifération des cellules endothéliales d'origine bovine ainsi que leur différenciation [87], ceci conduit à des structures tubulaires. Il stimule l'angiogenèse sur un modèle de CAM et la co-injection sous-cutanée à des souris de cellules endothéliales bovines prétraitées par l'ATRA avec du matrigel induit la néovascularisation au niveau du bouchon de matrigel.

### 3.5.2 Acide rétinoïque encapsulé :

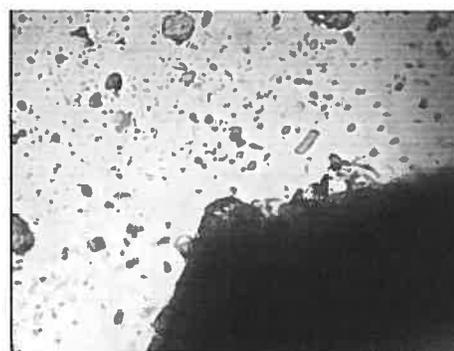
#### 3.5.2.1 Première culture à J7 :



**Culture témoin**



**En présence d'AR encapsulé  
( $2 \cdot 10^{-5}$  mol/L)**



**En présence d'AR encapsulé  
( $10^{-4}$  mol/L)**

*Figure 24 : Photos des différentes cultures en présence d'AR encapsulé à J7*

Tableau IX : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J7

J7	Culture témoin	En présence d'AR encapsulé ( $2.10^{-5}M$ )	En présence d'AR encapsulé ( $4.10^{-5}M$ )	En présence d'AR encapsulé ( $10^{-4}M$ )	En présence d'AR encapsulé ( $2.10^{-4}M$ )
Puits 1	5,6	1,4	2,5	0	0
Puits 2	6,1	3,6	4,6	0	0
Puits 3	4,5	2,7	0,4	0	0
Puits 4	-	2,3	0	0	0
Médiane	5,6	2,5	1,4	0	0
Moyenne	5,4	2,5	1,9	0	0
Ecart type	0,8	0,9	2,1	0	0
Pourcentage d'inhibition	0%	55%	75%	100%	100%

(- : culture perdue, car l'anneau mis en culture contenait du sang.)

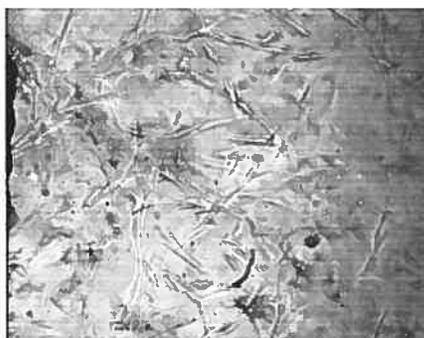
En exposant les anneaux d'aorte à l'acide rétinoïque encapsulé dans des nanosphères, on a noté une inhibition dose dépendante de la néoangiogenèse, cette inhibition est statistiquement significative pour les différentes concentrations utilisées en les rapportant à la culture témoin faite dans les mêmes conditions. En effet, à une concentration de  $2.10^{-5}mol/L$  on assiste à une inhibition de 55% ( $p=0,057$ ), elle est de 75% pour une concentration de  $4.10^{-5}mol/L$  ( $p=0,114$ ) et atteint les 100% à partir de  $10^{-4}mol/L$  ( $p=0,057$ ). Ces résultats ne sont pas différents selon le test de Mann-Whitney mais ils le sont selon le  $t$  de Student.

Cette culture n'a pu être gardée au-delà de 7 jours, car les suspensions de nanosphères n'étaient pas stériles et donc on a eu un développement de colonies bactériennes à la surface du collagène.

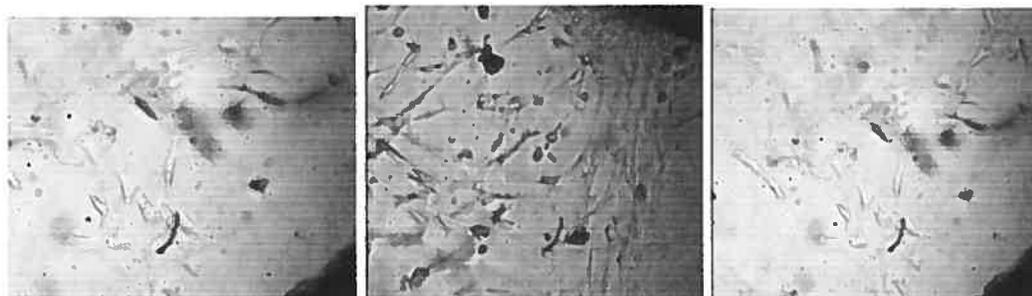
On a donc procédé à la stérilisation des suspensions de nanosphères; en effet, on a étalé les nanosphères sèches dans une boîte de pétri qu'on a placé sous une lampe UV pendant 15 minutes, puis on les a dispersées dans une solution aqueuse de cyclodextrine préalablement autoclavée, et on a de nouveau placé la suspension sous la lampe UV pendant 15 minutes.

Toutes ces opérations ont été effectuées sous une hotte stérile.

### 3.5.2.2 Deuxième culture à J7 :



*Culture témoin*



*Nanosphères d'AR  
 $10^{-5}$  mol/L*

*Nanosphères d'AR  
 $5.10^{-5}$  mol/L*

*Nanosphères d'AR  
 $10^{-4}$  mol/L*

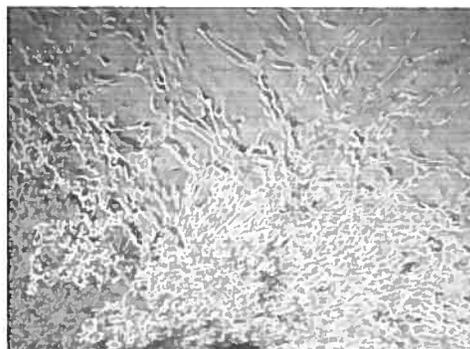
*Figure 25 : Photos des différentes cultures en présence d'AR encapsulé à J7*

Cette deuxième expérience montre une inhibition importante de l'angiogenèse : elle est de l'ordre de 89% pour une concentration de  $10^{-5}$  mol/L, de 63% pour  $5.10^{-5}$  mol/L et de 73% pour  $10^{-4}$  mol/L. On remarque que cette inhibition est indépendante de la dose et ne rejoint pas les résultats de la première expérience. De plus, l'inhibition obtenue, bien qu'elle soit importante pour les trois concentrations, elle n'est pas statistiquement significative par rapport aux cultures témoins.

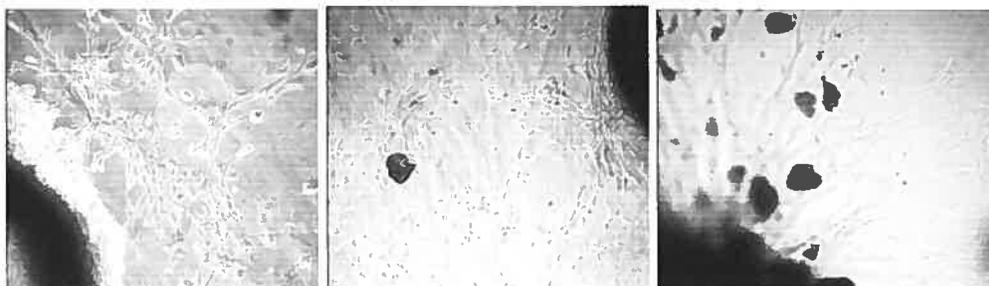
Tableau X : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J7

J7	Culture témoin	En présence d'AR encapsulé $10^{-5}$ mol/L	En présence d'AR encapsulé $5.10^{-5}$ mol/L	En présence d'AR encapsulé $10^{-4}$ mol/L
Puits 1	26,9	7,1	17,6	7,1
Puits 2	2,1	13,5	1,1	19,7
Puits 3	0	0	9,9	0
Puits 4	31,1	2,3	28,7	2,3
Puits 5	32,2	2,7	6,9	15,7
Médiane	26,9	2,7	9,9	7,1
Moyenne	18,5	5,1	12,8	8,9
Ecart type	16	5,3	10,6	8,4
Pourcentage d'inhibition	0%	89%	63%	73%

### 3.5.2.3 Deuxième culture à J15 :



*Culture témoin*



*Nanosphères d'AR  
 $10^{-5}$  mol/L*

*Nanosphères d'AR  
 $5 \cdot 10^{-5}$  mol/L*

*Nanosphères d'AR  
 $10^{-4}$  mol/L*

*Figure 26 : Photos des différentes cultures en présence d'AR  
encapsulé à J15*

Tableau XI : Densité vasculaire des cultures en présence d'AR encapsulé à J15

J15	Culture témoin	En présence d'AR encapsulé $10^{-5}$ mol/L	En présence d'AR encapsulé $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L	En présence d'AR encapsulé $10^{-4}$ mol/L
Puits 1	60,5	19,7	0	3,9
Puits 2	39,5	21,3	37,3	45,3
Puits 3	36,8	4,1	10,3	5,2
Puits 4	51,6	8,5	21,3	0
Puits 5	58,1	9,2	37,5	13,5
Médiane	51,6	9,2	21,3	5,2
Moyenne	49,3	12,5	21,2	13,5
Ecart type	10,7	7,5	16,5	18,4
Pourcentage d'inhibition	0%	82%	58%	89%

Quinze jours après la mise en culture, les pourcentages d'inhibitions sont légèrement modifiés cependant ils sont devenus statistiquement significatifs. En effet, à  $10^{-5}$ mol/L, l'inhibition est de 82% avec  $p=0,008$ , à  $5 \cdot 10^{-5}$ mol/L, elle est de 58% avec  $p=0,032$  et à  $10^{-4}$ mol/L, elle est de 89% avec  $p=0,032$  (par comparaison au témoin).

La différence notée entre les 2 expériences pourrait être expliquée par le fait que pour la première expérience les nanosphères pouvaient contenir de l'acide

rétinoïque libre à la surface des particules ce qui aurait agit comme dose de charge dès le premier jour, alors que pour la deuxième expérience, l'exposition des nanosphères à la lumière UV aurait détruit l'acide rétinoïque libre ce qui explique le délai d'action.

## 4 Conclusion :

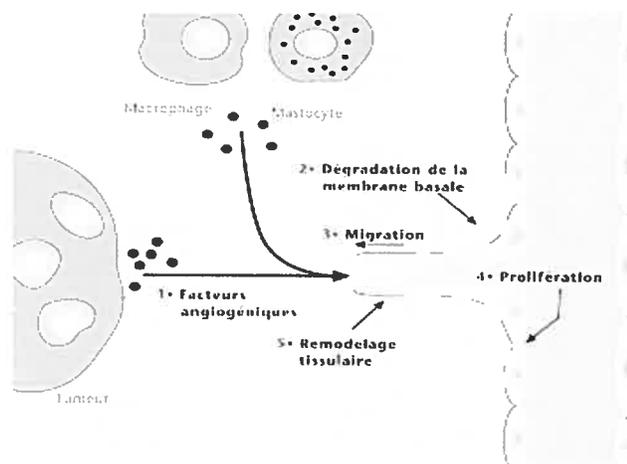
L'angiogenèse est un processus survenant aussi bien au cours de situations physiologiques qu'au cours de situations pathologiques telles que les maladies ischémiques, les maladies inflammatoires chroniques ainsi que la croissance tumorale.

La compréhension que la croissance tumorale est dépendante de l'angiogenèse a entraîné le développement de nouvelles stratégies pour le traitement direct au niveau de la vascularisation de la tumeur.

Des avancées importantes ont été réalisées au niveau de la compréhension des différentes voies de régulation impliquées dans les différentes étapes de l'angiogenèse.

En effet, l'angiogenèse tumorale peut être schématiquement divisée en 5 étapes :

- Production de facteurs angiogéniques par les différentes cellules ischémiques : signal angiogénique.
- Production de protéinases par les cellules vasculaires endothéliales permettant la destruction de la membrane basale les entourant.
- Migration des cellules endothéliales vers le signal angiogénique.
- Prolifération pour former des néovaisseaux.
- Formation de structures tubulaires avec une lumière et une nouvelle lame basale.



*Figure 27 : Angiogenèse tumorale*

Le concept que la croissance tumorale et sa métastatisation puissent être inhibées en supprimant l'angiogenèse tumorale a été largement confirmé dans des modèles tumoraux expérimentaux. Ces résultats ont fait naître l'idée que la suppression de l'angiogenèse tumorale puisse être utilisée pour traiter le cancer humain.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été développées pour pouvoir comparer l'efficacité des composés anti-angiogéniques. Afin de caractériser les effets potentiels de ces molécules, qui peuvent constituer une nouvelle approche pour traiter les maladies angiogéniques et les tumeurs solides, le modèle sur aorte de rat nous semble être le plus commode. De plus, ce modèle permet l'étude de la réponse angiogénique spontanée ainsi que le maintien du processus angiogénique.

Pour la quantification de la réponse aux facteurs anti-angiogéniques on s'est limité au calcul de la densité vasculaire suite à un traitement manuel des photos. Ceci constitue une limite pour cette étude qui devrait être complétée par le calcul du nombre, de la longueur et des embranchements des microvaisseaux.

Le but du projet consistait à mettre au point le test sur anneaux d'aorte de rat dans le but de nous permettre de tester :

- le 2-méthoxy-œstradiol en tant que produit de référence pour vérifier l'efficacité de la technique,
- le paclitaxel connu pour avoir des propriétés à la fois anticancéreuses et anti-angiogéniques,
- l'acide rétinoïque sous forme libre et encapsulée afin d'évaluer l'apport de l'encapsulation.

Les premières expériences réalisées dans le but de mettre au point la technique nous ont permis de noter que :

- la croissance vasculaire en fonction du temps suit une fonction exponentielle qui débute pendant la 1<sup>ère</sup> semaine suivant la mise en culture pour atteindre un plateau au-delà de la 3<sup>ème</sup> semaine,
- le délai d'apparition de nouveaux vaisseaux dépend de la corpulence du rat, en effet, on a noté que plus le rat est engraisé, plus ce délai augmente,
- l'erreur relative due à l'expérimentateur varie de 1 à 3%.

Les expériences testant les produits anti-angiogéniques ont les résultats suivants :

- le 2-méthoxy-œstradiol permet une inhibition de 95% pour une concentration de  $2.10^{-6}$  mol/L et de 100% pour une concentration de  $4.10^{-6}$  mol/L. Cette inhibition est statistiquement significative pour les deux concentrations comparées à la culture témoin :  $p=0,013$  pour 2ME ( $2.10^{-6}$  mol/L) et  $p=0,011$  pour 2ME ( $4.10^{-6}$  mol/L) ; cependant la différence entre les deux concentrations utilisées n'est pas statistiquement significative :  $p=0,69$ ,
- le paclitaxel a entraîné, une inhibition de la néoangiogénèse atteignant les 96 % et concentration dépendante. En effet, en utilisant des concentrations de

l'ordre de 10nM on n'a pas noté de différence avec le groupe témoin, le pourcentage d'inhibition est de 0% ( $p=0,9$ ). A des doses de  $100.10^{-9}$ mol/L le pourcentage d'inhibition est de 32% ( $p=0,245$ ). Enfin, à des doses plus importantes de l'ordre de  $1000.10^{-9}$ mol/L le pourcentage d'inhibition atteint 96% avec une différence statistiquement significative par rapport au groupe témoin ( $p=0,026$ ),

- l'acide rétinoïque montre un effet antiangiogénique à des doses de  $10^{-6}$ mol/L avec un pourcentage d'inhibition de 62% avec une différence statistiquement significative par rapport à la culture témoin ( $p=0,001$ ) sans différence notable lors de l'utilisation de concentrations plus importantes de l'ordre de  $10^{-4}$ mol/L

- les nanosphères donnent une meilleure inhibition que l'acide rétinoïque libre dans la mesure où ils sont accompagnés d'une dose de charge.

Ces résultats obtenus confortent l'hypothèse qui stipule que l'acide rétinoïque a une activité anti-angiogénique, cette hypothèse qui d'après les données de la littérature semble être vérifiée *in vivo* [88-90]. Cependant, les études *in vitro* montrent des résultats très variables notamment en ce qui concerne la production du VEGF qui selon le type de cellules utilisées peut être stimulée ou inhibée [86]. Les raisons pour lesquelles l'acide rétinoïque présente des effets controversés ne sont pas claires pour le moment, c'est pourquoi, il faudrait approfondir cette recherche afin de confirmer les résultats obtenus et d'essayer de trouver des explications concernant la variabilité de l'action de cette molécule.

Par ailleurs, l'utilisation de nanoparticules contribue non seulement à la protection d'un agent actif sensible, mais aussi à la vectorisation du médicament, en d'autres termes ces nanoparticules permettent le transport des molécules biologiquement actives jusqu'à leur cible biologique. Ceci est d'autant plus intéressant, que dans le cas d'utilisation d'agents

antiangiogéniques, il serait important de n'agir qu'au niveau du site de la pathologie.

Des essais d'encapsulation du paclitaxel sont en cours dans le laboratoire. Étant donné que cette molécule est connue pour avoir une activité antinéoplasique en plus de son activité antiangiogénique, il serait intéressant de pouvoir la vectoriser et cibler ainsi le site tumoral. Des études *in vivo*, notamment sur un modèle de tumeur, seraient souhaitables pour compléter ce projet.

Enfin, je dirai que ce travail ne constitue qu'une infime partie et que les inhibiteurs de l'angiogenèse sont des drogues cytostatiques qui nécessitent de plus amples investigations expérimentales ainsi qu'une évaluation clinique adéquate. Il est aussi important que ces agents gagnent les cellules endothéliales cibles ainsi que le microenvironnement avec des concentrations optimales afin de pouvoir affecter correctement le compartiment stromal de la tumeur.

## 5 Bibliographie

1. Folkman J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med., 1971. **285**: p. 1182-1186.
2. Folkman J, B.T., Palmblad, *Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application*. J. Thromb Haemost, 2001. **86**: p. 23–33.
3. Robbins et coll., *Neoplasia (chapitre 8)*,. in Robbin's pathologic basis of disease, 6e édition.
4. Boehm-Viswanathan T et coll., *Is angiogenesis the holy grail of cancer therapy ?* Current opinion in oncology, 2000. **12**: p. 89-94.
5. Harris A et coll., *Antiangiogenesis for cancer therapy*. Lancet, 1997. **349**: p. SII13-SII15.
6. Arap RD, H.M., Koivunen E, Pasqualini R, Ruoslahti E., *Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display*. J Clin Invest, 1998. **102**: p. 430–7.
7. Ferrara N., e.c., *Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors*. Nature Medicine, 1999. **5**(12): p. 1359-1364.
8. Gasparini Ciampietro et coll., *The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia*. Drugs, 1999. **58**(1): p. 17-38.
9. Nicosia R.F., O.A., *Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro*. Lab. Invest., 1990. **63**: p. 115-122.

10. G. Gastel, T.H., M. Steurer, J. Zmija, E. Gunsilius, C. Unger, A. Kraft, *Angiogenesis as a target for tumor treatment*. *Oncology*, 1997. **54**: p. 177-184.
11. VAILHE B., V.D.F.J.-J., *In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis*. *Lab. Invest.*, 2001. **81**: p. 439-452.
12. A. Bikfalvi, S.J., C. Perrolet, C. Savona, *Angiogenèse et cancer*. *Bull. Cancer*, 1997. **84**(9): p. 885-890.
13. Pralhad T, M.S., Rajendrakumar K., *Concept, mechanisms and therapeutics of angiogenesis in cancer and other diseases*. *J Pharm Pharmacol.*, 2003. **55**(8): p. 1045-1053.
14. Haller, *Endothelial function : general considerations*. *Drugs*, 1997. **57**(S1): p. 1-10.
15. Dameron K.M., V.O.V., Tainsky M.A., Bouck N., *Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1*. *Science*, 1994. **265**: p. 1582-1584.
16. Kim K., e.c., *Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo*. *Nature*, 1993. **362**: p. 841-844.
17. Fabrice Le Boeuf, F.H.J.H., *Regulation of vascular endothelial growth factor receptor 2 mediated phosphorylation of focal adhesion kinase by heat shock protein 90 and Src kinase activities*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004. **279**(37): p. 39175-39185.
18. Helena Pavlakovic, W.H.L.S., *Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: Implications for anti-angiogenic tumour therapy*. *Angiogenesis*, 2001. **4**: p. 259-262.
19. Gunter Schuch, O.K., Anthony Atala & Shay Soker, *Pancreatic tumor growth is regulated by the balance between positive and negative modulators of angiogenesis*. *Angiogenesis*, 2002. **5**: p. 181-190.

20. Bikfalvi A, H.Z., *Angiogenic factors are hematopoietic growth factors and vice versa*. *Leukemia*, 1994. **8**: p. 523-529.
21. Sung Pil Jung, B.S.e.a., *Effect of human Angiostatin protein in hu,an angiogenesis in vitro*. *Angiogenesis*, 2003. **6**: p. 223-240.
22. O'Reilly MS, B.T., Shing Y, et al., *Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth*. *Cell.*, 1997. **88**: p. 277-285.
23. Ratain, J.M., *Endostatin : Are the two years up yet?* *journal of clinical oncology*, 2002. **20**(18): p. 3758-3760.
24. Folkman J, K.M., *Angiogenic factors*. *Science.*, 1987. **235**: p. 442-447.
25. L. M. Ellis, I.J.F., *Angiogenesis and metastasis*. *European Journal of Cancer*, 1996. **32A**(14): p. 2451-2460.
26. Rüegg, C., *Une nouvelle cible pour la thérapeutique anticancéreuse: la vascularisation tumorale. Nouveaux paradigmes et questions non résolues*. *Forum Med Suisse*, 2002. **14**: p. 317-323.
27. Denis Gingras, R.B., *L'angiogenèse tumorale : une nouvelle cible thérapeutique anticancéreuse*. *Les sélections de médecine/sciences*, 1998. **9**: p. 23-29.
28. Robert Auerbach, R.L., Brenda Shinnors, Louis Kubai, and Nasim Akhtar, *Angiogenesis Assays: A Critical Overview*. *Clinical Chemistry*, 2003. **49**(1): p. 32-40.
29. Auerbach R., *Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anticancer strategies*. *Int J Radiat Biol*, 1991. **60**: p. 1-10.
30. Gumkowski F, K.G., Kaminski M, Morisset LM, Auerbach R., *Heterogeneity of mouse vascular endothelium: In vitro studies of lymphatic, large blood vessel and microvascular endothelial cells*. *Blood Vessels*, 1987. **24**: p. 11-23.
31. Zetter BR., *The cellular basis of site-specific tumor metastasis*. *New England J Med*, 1990. **322**: p. 603-12.

32. Auerbach R, A.W., Polakowski I., *Assays for angiogenesis*. Pharmacol Ther, 1991. **51**: p. 1–11.
33. Obeso JL, A.R., *A new microtechnique for quantitating cell movement in vitro using polystyrene bead monolayers*. J Immunol Methods, 1984. **70**: p. 141-52.
34. ObesoJ, W.J., Auerbach R., *A hemangioendothelioma-derived cell line its use as a model for the study of endothelial cell biology*. Lab Invest., 1990. **63**: p. 259-69.
35. Lansink M, K.P., Van Hinsbergh V, Kooistra T., *Effect of steroid hormones and retinoids on the formation of capillary-like tubular structures of human microvascular endothelial cells in fibrin matrices is related to urokinase expression*. Blood, 1998. **92**: p. 927-938.
36. Madri JA, P.B., Tucker AM., *Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-B depends upon the composition and organization of the extracellular matrix*. J Cell Biol, 1988. **106**: p. 1375–84.
37. Plendl J, H.L., Auerbach R., *Organ-specific change in Dolichos biflorus lectin binding by myocardial endothelial cells during in vitro cultivation*. In Vitro Cell Dev Biol, 1993. **29A**: p. 25-31.
38. Naoko HATA-SUGI, R.K.-K., and Toshiaki WAKABAYASHI, *Characterization of Rat Aortic Fragment within Collagen Gel as an Angiogenesis Model; Capillary Morphology may Reflect the Action Mechanisms of Angiogenesis Inhibitors*. Biol. Pharm. Bull, 2002. **25**(4): p. 446-451.
39. Muthukkaruppan VR, S.B., Lewis R, Park S-J, Baechler BJ, Auerbach R., *The chick embryo aortic arch assay: a new, rapid, quantifiable in vitro method for testing the efficacy of angiogenic and anti-angiogenic factors in a three-dimensional, serum free organ culture system*. Proc Am Assoc Cancer Res, 2000. **41**: p. 65.

40. Padhani AR, N.M., *Challenges for imaging angiogenesis*. Br J Radiol, 2001. **74**: p. 886–90.
41. Brooks PC, M.A., Cheresch DA., *Use of the 10-day-old chick embryo model for studying angiogenesis*. Methods Mol Biol, 1999. **129**: p. 257–69.
42. Auerbach R, K.L., Knighton D, Folkman J., *A simple procedure for the long term cultivation of chicken embryos*. Dev Biol, 1974. **41**: p. 391–4.
43. Muthukkaruppan VR, A.R., *Angiogenesis in the mouse cornea*. Science, 1979. **205**: p. 1416–8.
44. Muthukkaruppan VR, K.L., Auerbach R., *Tumor-induced neovascularization in the mouse eye*. J Natl Cancer Inst., 1982. **69**: p. 699–708.
45. Kisker O, B.C., Prox D, Fannon M, D'Amato R, Flynn E, et al., *Continuous administration of endostatin by intraperitoneally implanted osmotic pump improves the efficacy and potency of therapy in a mouse xenograft tumor model*. Cancer Res., 2001. **61**: p. 7669–74.
46. Akhtar N, A.R., *The sponge Matrigel angiogenesis assay*. Angiogenesis, 2002. **5**: p. in press.
47. Kenyon BM, V.E., Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ., *A model of angiogenesis in the mouse cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**: p. 1625–32.
48. Johns A, F.A., Fraser W, Korach KS, Rubanyi GM., *Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 $\beta$  estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice*. Endocrinology, 1996. **137**: p. 4511–3.
49. Giulia Taraboletti, G.M., Monica Rieppi, Maura Poli, Michele Turatto, Cosmo Rossi, Patrizia Borsotti, Paola Roccabianca, Eugenio Scanziani, Maria Ines Nicoletti, Ezio Bombardelli, Paolo Morazzoni, Antonella Riva, and Raffaella Giavazzi, *Antiangiogenic and Antitumor Activity of*

- IDN 5390, a New Taxane Derivative*. *clinical Cancer Research*, 2002. **8**: p. 1182-1188.
50. Folkman J., *New directions in angiogenesis research (abstract 31)*. 10th NCI-EORTC symposium in new drugs in cancer therapy, 1998: p. 16-19.
  51. Rosen, L., *Antiangiogenic Strategies and Agents in Clinical Trials*. *The Oncologist*, 2000. **5**: p. 20-27.
  52. R. Longo, R.S., M. Fanelli, B. Capaccetti, D. Gattuso & G. Gasparini, *Anti-angiogenic therapy: Rationale, challenges and clinical studies*. *Angiogenesis*, 2002. **5**: p. 237-256.
  53. Eppenberger U, K.W., Schlaepfli J-M, *Markers of tumor angiogenesis and proteolysis independently define high and low risk subsets of node-negative breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(31): p. 3129-3136.
  54. Prewett M, H.J., Li Y et al., *Antivascular endothelial growth factor receptor 5flk1) monoclonal antibody inhibits tumor angiogenesis and growth of several mouse and human tumors*. *Cancer Res*, 1999. **59**(5209-5218).
  55. Dirk B. Mendel, R.E.S., David C. West, Guangmin Li, Laurie M. Strawn, Sheila S. Tanciongco, Stefan Vasile, Laura K. Shawver, and Julie M. Cherrington, *The Angiogenesis Inhibitor SU5416 Has Long-lasting Effects on Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Phosphorylation and Function*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**: p. 4848-4858.
  56. Pamela A. Pavco, K.S.B., Anna M. Gallegos, Arun Agrawal, Tom J Parry, *Antitumor et antimetastatic activity of ribozymes targeting the messenger RNA of vascular endothelial growth factor receptors*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**: p. 2094-2103.
  57. Zucker S, H.M., Conner C, *Measurement of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinases in blood and tissues*.

- Clinical and experimental applications*. Ann. N Y ACAD Sci, 1999. **878**: p. 212-227.
58. Gasparini G, M.A., Magnani E et al., *Thalidomide : an old sedative-hypnotic with anticancer activity?* Curr Opin Invest Drugs, 2001. **2**(9): p. 1302-1308.
59. Marx GM, M.S., Boyle F et al., *Phase II study of thalidomide as an anti-angiogenic agent in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme*. Proc Am Soc Clin Oncol 2000, 2000. **abstr613**.
60. Fine HA, F.W., Jaeckle K et al., *Phase II trial of the angiogenic agent thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas*. J Clin Oncol, 2000. **18**(4): p. 708-15.
61. Senghal S, M.J., Desikan R et al., *Anti-tumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma*. New Engl J Med, 1999. **341**: p. 1565-71.
62. Huang X, M.G., King S et al, *Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature*. Science, 1997. **275**(547-550).
63. Arjan W, G., Grietje M, *Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases and chronic inflammation*. Blood, 2000. **52**(2): p. 237-268.
64. Frankel A-E, F.D., Siegall C, Press O-W, *Advances in immunotoxin biology and therapy : A summary of the fourth international symposium of immunotoxins*. Cancer Res, 1996. **56**(926-932).
65. Hagemeyer HH, V.E., Goerdts S, Schulze Osthoff K, Sorg C, *A monoclonal antibody reacting with endothelial cells of budding vessels in tumor and inflammatory tissues, and non-reactive with normal adult tissues*. Int J Cancer, 1986. **38**: p. 481-488.
66. Silvia Blacher, L.D., Mike F. Burbridge, Guy Roland, Gordon Tucker, Agnes Noël & Jean-Michel Foidart, *Improved quantification of*

- angiogenesis in the rat aortic ring assay*. *Angiogenesis*, 2001. **4**: p. 133-142.
67. Tom Elsdale, J.B., *COLLAGEN SUBSTRATA FOR STUDIES ON CELL BEHAVIOR*. *The Journal of Cell Biology*, 1972. **54**: p. 626-637.
68. Weirong Shanga, I.K.a.D.W.S., *2-Methoxyestradiol, an Endogenous Estradiol Metabolite, Differentially Inhibits Granulosa and Endothelial Cell Mitosis: A Potential Follicular Antiangiogenic Regulator*. *Biology of Reproduction*, 2001. **65**: p. 622-627.
69. Yue, T.L., Wang, X., Louden, C.S., Gupta, S., and K. Pillarisetti, Gu, J.L., Hart, T.K., Lysko, P.G. & Feuerstein, G.Z., *2-Methoxyestradiol, an endogenous estrogen metabolite, induces apoptosis in endothelial cells and inhibits angiogenesis: Possible role for stress activated protein kinase signaling pathway and Fas expression*. *Mol. Pharmacol.*, 1997. **51**: p. 951-962.
70. Shang, W., Konidari, I. & Schomberg, D. W., *2-Methoxyestradiol, an endogenous estradiol metabolite, differentially inhibits granulosa and endothelial cell mitosis: A potential follicular antiangiogenic regulator*. *Biol. Reprod.*, 2001. **65**: p. 622-627.
71. Banerjeei, S.K., Zoubine, M.N., Sarkar, D.K., Weston, A.P., Shah, J.H. & Campbell, D.R., *2-Methoxyestradiol blocks estrogen-induced rat pituitary tumor growth and tumor angiogenesis: Possible role of vascular endothelial growth factor*. *Anticancer Res.*, 2000. **20**: p. 2641-45.
72. Klauber, N., Parangi, S., Flynn, E., Hamel, E. & D'Amato, R.J., *Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol*. *Cancer Res.*, 1997. **57**: p. 81-86.
73. Qadan, L.R., Perez-Stable, C.M., Anderson, C., D'Ippolito, G., Herron, A., Howard, G.A. & Roos, B.A., *2-Methoxyestradiol induces G2/M*

- arrest and apoptosis in prostate cancer*. Res. Commun., 2001. **285**: p. 1259-66.
74. Justyna Golêbiewska, P.R., Jan Henryk Spodnik, Narcyz Knap, Takashi Wakabayashi and Michal Wozniak, *Dual effect of 2-methoxyestradiol on cell cycle events in human osteosarcoma 143B cells*. Acta biochimica polonica, 2002. **49**: p. 59-65.
75. C Delescluse, M.C., B Martin, BA Bernard, U Reichert, J Maignan, M Darmon and B Shroot, *Selective high affinity retinoic acid receptor alpha or beta-gamma ligands*. J Biol Chem, 1999. **274**(22): p. 15781-15785.
76. Chen J. Y., C.J., Zusi C., Starrett J., Tortolani D., Ostrowski J., Reczek P. R., Chambon P., Gronemeyer H., *Two distinct actions of retinoid-receptor ligands*. Nature, 1996. **382**: p. 819-822.
77. Weninger W., R.M., Mildner M., Tschachler E., *Retinoids downregulate vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor production by normal human keratinocytes*. J. Investig. Dermatol., 1998. **111**: p. 907-911.
78. Soumitro Pal, M.L.I.-A., V. Susan Harvey et al., *Retinoic acid selectively inhibits the vascular permeabilising effect of VPF/VEGF; an early step in the angiogenic cascade*. Microvascular research, 2000. **60**: p. 112-120.
79. J. Stiffey-Wilusz, J.A.B., J. Ronan, A. M. Fletcher, M. S. Anderson, *An ex vivo angiogenesis assay utilizing commercial porcine carotid artery : Modification of the rat aortic ring assay*. Angiogenesis, 2001. **4**: p. 3-9.
80. wen Hui Zhu, M.I., Angela MacIntyre, Eric Fogel and Roberto F Nicosia, *The mouse aorta model : Influence of genetic background and aging on bFGF and VEGF induced angiogenic sprouting*. Angiogenesis, 2003. **6**: p. 193-199.

81. Fotosis T, Z.Y., Pepper MS, Qdlercreutz H, Montesano R, Nawroth PP, Schzeigerer L., *The endogenous oestrogen ,etabolite 2-,ethoxyoestradiol inhibits angiogenesis and suppresses tumour growth.* Nature, 1994. **368**: p. 237-239.
82. Belotti, D., Vergani, V., Drudis, T., Borsotti, P., Pitelli, M. R., Viale, G., Giavazzi, R., and Taraboletti, G., *The microtubule-affecting drug paclitaxel has antiangiogenic activity.* clinical Cancer Research, 1996. **2**: p. 1843-1849.
83. Lau DH, X.L., Young LJ, Burke PA, Cheung AT., *Paclitaxel (Taxol) : an inhibitor of angiogenesis in a highly vascularized transgenic breast cancer.* Cancer Biother Radiopharm., 1999. **14**: p. 31-36.
84. Lingen MW, P.P., Bouck NP., *Inhibition of squamous cell carcinoma angiogenesis by direct interaction of retinoic acid with endothelial cells.* Lab Invest., 1996. **74**: p. 476-483.
85. Bárbara Vega Diaz, M.-C.L., Annie Ladoux, Christian Frelin, Michel Démarchez, and Serge Michel, *Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Human Keratinocytes by Retinoids.* J Biol Chem, 2000. **275**(1): p. 642-650.
86. Toshitaka Maeno, T.T., Yoshichika Sando, Tatsuo Suga et al., *Stimulation of Vascular Endothelial Grozth Factor Gene Transcription by all trans Retinoic Acid through Sp1 and Sp3 Sites in human Bronchioloalveolar carcinoma Cells.* Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 2002. **26**: p. 246-253.
87. Carlo Gaetano, A.C., Barbara Illi, Angelina Felici, Saverio Minucci, Roberta Palumbo, Francesco Facchiano, Antonella Mangoni, Salvatore Mancarella, Judith Mühlhauser, Maurizio C. Capogrossi, *Retinoids Induce Fibroblast Growth Factor-2 Production in Endothelial Cells via Retinoic Acid Receptor a Activation and Stimulate Angiogenesis In Vitro and In Vivo.* Circulation Research, 2001. **88**: p. e38-e47.

88. Liaudet Coopman E.D., B.G.J., Wellstein Q., *In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 1997. **3**: p. 179-184.
89. Oikawa T., H.K., Nakamura O., Shudo K., *Q highly potent antiangiogenic activity of retinoids*. Cancer Lett., 1989. **48**: p. 157-162.
90. Szmurlo A., M.M., Jablonska S., Bollag W., *Antitumor action of tumor cell line induced angiogenesis and prevention of tumor in mice*. Dermatology, 1992. **184**: p. 116-119.