



**HAL**  
open science

**Ciblage de neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la Thérapie Photodynamique**  
Une étude de stabilité de la molécule conjuguée a été réalisée in vitro et in vivo. Si le peptide est relativement stable jusqu'à 4h après injection intraveineuse in vivo, l'utilisation de pseudo-peptides plus résistants aux peptidases permettrait une efficacité encore supérieure.

Lorraine Tirand

► **To cite this version:**

Lorraine Tirand. Ciblage de neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la Thérapie Photodynamique Une étude de stabilité de la molécule conjuguée a été réalisée in vitro et in vivo. Si le peptide est relativement stable jusqu'à 4h après injection intraveineuse in vivo, l'utilisation de pseudo-peptides plus résistants aux peptidases permettrait une efficacité encore supérieure.. Ingénierie biomédicale. Université Henri Poincaré - Nancy I, 2007. Français. NNT : . tel-00198834

**HAL Id: tel-00198834**

**<https://theses.hal.science/tel-00198834>**

Submitted on 18 Dec 2007

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

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

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I  
FACULTE DE MEDECINE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

*Discipline : Bio ingénierie*

Présentée et soutenue publiquement

par **Loraine TIRAND**

le 6 mars 2007

**Ciblage de neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour  
potentialiser l'effet anti-vasculaire de la Thérapie  
Photodynamique**

**Membres du jury:**

**Juges:**

Muriel BARBERI-HEYOB	Docteur (HDR), Nancy	<i>Directrice de thèse</i>
Céline FROCHOT	Docteur, Nancy	<i>Co-Directrice de thèse</i>
François GUILLEMIN	Professeur, Nancy	
Gérard DELERIS	Professeur, Bordeaux	
Dominique DUMAS	Docteur, Nancy	<i>Invité</i>

**Rapporteurs:**

Jacques PIETTE	Directeur de Recherche, Liège
Serge MORDON	Professeur, Lille

---

**Centre Alexis Vautrin (CAV)- CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL  
avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-les-Nancy**

# SOMMAIRE

<b>I</b>	<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	<b>1</b>
<b>II</b>	<b>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>3</b>
<b>II.1</b>	<b>LA NEOVASCULARISATION DANS LE PROCESSUS DE DEVELOPPEMENT TUMORAL</b>	<b>3</b>
II.1.1	<i>Le processus de cancérisation</i>	3
II.1.2	<i>Les vaisseaux sanguins</i>	3
II.1.3	<i>Les différents processus de formation des néovaisseaux</i>	5
II.1.4	<i>L'angiogenèse tumorale</i>	7
II.1.5	<i>Les inducteurs et inhibiteurs naturels de l'angiogenèse</i>	12
<b>II.2</b>	<b>LE FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF)</b>	<b>15</b>
II.2.1	<i>Le VEGF et la famille du VEGF</i>	15
II.2.1.1	Le VEGF (ou VEGF-A)	15
II.2.1.1.1	Rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique et pathologique	15
II.2.1.1.2	Régulation de l'expression du VEGF	16
II.2.1.1.3	Structure et isoformes du VEGF	18
II.2.1.2	Les autres membres de la famille du VEGF	21
II.2.1.2.1	Le facteur de croissance placentaire (PlGF)	21
II.2.1.2.2	Le VEGF-B	22
II.2.1.2.3	Le VEGF-C et le VEGF-D	22
II.2.1.2.4	Le VEGF-E	23
II.2.1.2.5	Le VEGF-F	23
II.2.2	<i>Les récepteurs au VEGF</i>	23
II.2.2.1	Les récepteurs à activité tyrosine kinase	24
II.2.2.1.1	Caractéristiques communes	24
II.2.2.1.2	Le récepteur au VEGF de type 1 (VEGFR-1, Flt-1)	25
II.2.2.1.3	Le récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1)	26
II.2.2.1.4	Le récepteur au VEGF de type 3 (VEGFR-3, Flt-4)	29
II.2.2.2	Les neuropilines	29
II.2.2.2.1	Structure des neuropilines	30
II.2.2.2.2	Ligands des neuropilines	30
II.2.2.2.3	Expression des neuropilines	31
II.2.2.2.4	Effets médiés par les neuropilines	32
<b>II.3</b>	<b>THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE ET THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE</b>	<b>36</b>
II.3.1	<i>Thérapie anti-angiogénique</i>	36
II.3.1.1	Les avantages de la thérapie anti-angiogénique	36
II.3.1.2	Exemples de thérapies anti-angiogéniques	37
II.3.2	<i>Thérapie anti-néovasculaire</i>	41
II.3.2.1	Le ciblage vasculaire	41
II.3.2.2	La thérapie métronomique	44
II.3.2.3	La thérapie photodynamique	45
<b>II.4</b>	<b>LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)</b>	<b>46</b>
II.4.1	<i>Historique</i>	46
II.4.2	<i>Principe</i>	47
II.4.3	<i>Les réactions photochimiques</i>	49
II.4.3.1	Les réactions photochimiques de type I	50
II.4.3.2	Les réactions photochimiques de type II	51
II.4.4	<i>Le photosensibilisateur idéal</i>	54
II.4.5	<i>Les mécanismes de destruction tumorale après PDT</i>	56
II.4.5.1	Effet direct	56
II.4.5.2	Effets indirects	57
II.4.5.2.1	L'effet anti-vasculaire	57
II.4.5.2.2	Les effets inflammatoires et immunitaires	62
<b>II.5</b>	<b>MODELES POUR L'EVALUATION DES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES ET ANTI-NEOVASCULAIRES</b>	<b>65</b>

II.5.1	<i>Les modèles in vitro</i> .....	65
II.5.1.1	Choix des cellules endothéliales.....	65
II.5.1.2	Les tests de migration des cellules endothéliales.....	66
II.5.1.3	Les tests de prolifération des cellules endothéliales.....	68
II.5.1.4	Les tests de différenciation (formation de tubes capillaires).....	68
II.5.1.5	L'anneau aortique.....	69
II.5.2	<i>Les modèles in vivo</i> .....	70
II.5.2.1	La membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet.....	70
II.5.2.2	L'angiogenèse cornéenne.....	71
II.5.2.3	Le modèle du sac à air dorsal.....	72
II.5.2.4	Les chambres transparentes et la microscopie intravitale.....	72
II.5.2.5	Les implants sous-cutanés.....	73
II.5.2.6	Les modèles tumoraux.....	74
II.5.2.7	Les méthodes d'estimation des effets anti-angiogéniques et anti-vasculaires.....	78
II.5.2.7.1	Visualisation des vaisseaux sanguins.....	78
II.5.2.7.2	Mesure de la perfusion tumorale.....	79
II.5.2.7.3	Mesure de l'oxygénation.....	81
<b>III</b>	<b>OBJECTIFS</b> .....	<b>85</b>
<b>IV</b>	<b>RESULTATS</b> .....	<b>86</b>
<b>IV.1</b>	<b>SYNTHESE ET ETUDE PHOTOPHYSIQUE</b> .....	<b>86</b>
IV.1.1	<i>Introduction</i> .....	86
IV.1.2	<i>Matériel et Méthodes</i> .....	88
IV.1.2.1	Synthèse peptidique sur phase solide.....	88
IV.1.2.2	Purifications.....	91
IV.1.2.3	Caractérisations chimiques.....	91
IV.1.2.3.1	Spectrométrie de masse.....	91
IV.1.2.3.2	Résonance Magnétique Nucléaire.....	92
IV.1.2.3.3	Caractère hydrophile/hydrophobe.....	92
IV.1.2.4	Caractérisations photophysiques.....	93
IV.1.2.4.1	Absorption UV-visible.....	93
IV.1.2.4.2	Fluorescence.....	93
IV.1.2.4.3	Rendement quantique d'oxygène singulet.....	94
IV.1.2.4.4	Sections efficaces d'absorption à deux photons.....	95
IV.1.3	<i>Résultats et Discussion</i> .....	96
IV.1.3.1	Synthèse, purifications et identité chimique.....	96
IV.1.3.2	Caractère hydrophile/hydrophobe.....	98
IV.1.3.3	Caractérisations photophysiques.....	98
IV.1.3.3.1	Absorption, fluorescence et génération d'oxygène singulet.....	98
IV.1.3.3.2	Excitation biphotonique.....	99
IV.1.4	<i>Conclusions</i> .....	100
<b>IV.2</b>	<b>ETUDE IN VITRO</b> .....	<b>101</b>
	Tirand <i>et al.</i> <i>J Control Release</i> , 2006; <b>111</b> (1-2): 153-64.....	102
<b>IV.3</b>	<b>ETUDE IN VIVO</b> .....	<b>114</b>
IV.3.1	<i>Caractérisation du modèle</i> .....	115
IV.3.1.1	Introduction.....	115
IV.3.1.2	Matériel et Méthodes.....	115
IV.3.1.2.1	Modèle animal.....	115
IV.3.1.2.2	Expression de la NRP-1 par Western blot.....	116
IV.3.1.2.3	Taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux par ELISA.....	117
IV.3.1.3	Résultats et Discussion.....	118
IV.3.1.3.1	Expression de la NRP-1 par les cellules tumorales.....	118
IV.3.1.3.2	Taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux.....	119
IV.3.1.4	Conclusions.....	120
IV.3.2	<i>Pharmacocinétique plasmatique et biodistribution tumorale</i> .....	121
IV.3.2.1	Introduction.....	121
IV.3.2.2	Matériel et Méthodes.....	121
IV.3.2.2.1	Protocole.....	121

IV.3.2.2.2	Extraction du PS et méthode HPLC .....	121
IV.3.2.3	Résultats et Discussion .....	122
IV.3.2.4	Conclusions .....	123
<b>IV.3.3</b>	<b>Optimisation des facteurs de la PDT : présentation de l'outil «plan d'expériences».....</b>	<b>125</b>
IV.3.3.1	Introduction .....	125
IV.3.3.2	Matériel et Méthodes .....	127
IV.3.3.2.1	Choix du type de matrice et analyse des résultats .....	127
IV.3.3.2.2	Facteurs et valeurs limites de ces facteurs.....	128
IV.3.3.2.3	Protocole de PDT .....	128
IV.3.3.2.4	Suivi de volume tumoral et modèle de croissance tumorale.....	129
IV.3.3.2.5	Choix des réponses.....	129
IV.3.3.3	Résultats et Discussion .....	130
IV.3.3.3.1	Matrice d'expériences .....	130
IV.3.3.3.2	Résultats du plan d'expériences .....	130
IV.3.3.4	Conclusions .....	133
<b>IV.3.4</b>	<b>Evaluation des effets de la PDT : comparaison de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR.....</b>	<b>136</b>
IV.3.4.1	Introduction .....	136
IV.3.4.2	Matériel et Méthodes .....	136
IV.3.4.2.1	Protocole de PDT .....	136
IV.3.4.2.2	Mesure du flux sanguin pendant PDT .....	137
IV.3.4.2.3	Marquage des vaisseaux sanguins par immunohistochimie 24 heures après PDT .....	138
IV.3.4.2.4	Suivi de croissance tumorale après PDT .....	142
IV.3.4.3	Résultats et Discussion .....	142
IV.3.4.3.1	Suivi du flux sanguin pendant PDT.....	142
IV.3.4.3.2	Impact de la PDT sur les vaisseaux sanguins .....	145
IV.3.4.3.3	Suivi de la croissance tumorale après PDT .....	149
IV.3.4.4	Conclusions .....	151
<b>IV.4</b>	<b>ETUDE DE STABILITE IN VITRO ET IN VIVO.....</b>	<b>152</b>
	Tirand <i>et al. Drug Metab Dispos</i> , 2007; <b>35</b> (5): 806-13.....	154

**V SYNTHÈSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS ..... 162**

**VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 164**

**VII RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES ..... 167**

**ANNEXES**

Liste des publications, communications orales et par affiches, formations et enseignements.

- Schneider, Tirand *et al.* Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006; **6**(5): 469-88.
- Bastogne, Tirand *et al.* Modélisation système de la thérapie photodynamique. *Sciences et Technologies de l'Automatique*, 2006; **3**(2).

## LISTE DES TABLEAUX

### Partie II: Synthèse bibliographique

Tableau 1. Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins chez l'homme.....	4
Tableau 2. Les principaux facteurs pro-angiogéniques .....	14
Tableau 3. Les principaux facteurs anti-angiogéniques .....	14
Tableau 4. Affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs de cette famille.....	21
Tableau 5. Principales molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des récepteurs au VEGF ..	40
Tableau 6. Principaux peptides spécifiques de récepteurs au VEGF. ....	43
Tableau 7. Caractéristiques des principaux photosensibilisateurs ayant une AMM .....	46
Tableau 8. Avantages et inconvénients des principaux tests <i>in vivo</i> utilisés pour l'évaluation d'agents anti-angiogéniques.....	77

### Partie IV: Résultats

Tableau 9. Déplacements chimiques des protons de ATWLPPR dans le DMSO deutéré. ....	97
Tableau 10. Déplacements chimiques des protons de Ahx-ATWLPPR dans le DMSO deutéré.....	97
Tableau 11. Propriétés photophysiques de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol .....	99
Tableau 12. Taux de VEGF diffusible (humain et murin) plasmatique et intratumoral.....	120
Tableau 13. Paramètres de pharmacocinétique plasmatique, avec une dose de 0,7 ou 2,8 mg/kg de TPC-Ahx-ATWLPPR, calculés en utilisant une méthode non-compartmentale.....	122
Tableau 14. Bornes (inférieure et supérieure) et nombre de niveaux des 3 facteurs du plan d'expériences. ....	128
Tableau 15. Matrice d'expériences.....	130
Tableau 16. Correspondance entre les valeurs réduites des facteurs irradiance, fluence et dose de PS, et leurs valeurs «vraies».....	131
Tableau 17. Coefficients du modèle quadratique pour les 3 variables : irradiance (entre 50 et 150 mW/cm <sup>2</sup> ), fluence (de 10 à 150 J/cm <sup>2</sup> ) et dose de PS (entre 0,70 et 2,80 mg/kg) .....	131
Tableau 18. Composition du fixateur pour l'immunohistochimie .....	139

# LISTE DES FIGURES

## Partie II: Synthèse bibliographique

Figure 1. Schéma d'un capillaire sanguin. ....	5
Figure 2. Etapes de l'angiogenèse. ....	10
Figure 3. Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux et tumoraux. ....	11
Figure 4. Sac vitellin chez des embryons de souris E10,5 VEGF <sup>+/+</sup> ou VEGF <sup>+/-</sup> (49). Il n'existe pas de réseau vasculaire apparent chez les embryons hétérozygotes, non viables.....	15
Figure 5. Représentation en hélice $\alpha$ et feuillet $\beta$ du VEGF monomère et dimère .....	18
Figure 6. Structure en exons du VEGF .....	20
Figure 7. Caractéristiques structurales principales des récepteurs de la famille du VEGF.....	24
Figure 8. Signalisation intracellulaire médiée par le VEGFR-2.....	28
Figure 9. Interaction de la NRP-1 avec VEGFR-2/KDR .....	34
Figure 10. Principaux agents inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales et de leur prolifération.....	39
Figure 11. Comparaison du protocole de chimiothérapie traditionnel avec le protocole métronomique, en combinaison ou non avec d'autres molécules.....	44
Figure 12. Structure chimique des principaux PS. ....	47
Figure 13. Schéma résumant le principe de la PDT. ....	48
Figure 14. Les réactions photochimiques de type I et II .....	50
Figure 15. Diagramme de Jablonski.....	53
Figure 16. Pénétration de la lumière dans les tissus.....	55
Figure 17. Schéma récapitulatif des mécanismes de destruction tumorale associés à la PDT .....	63
Figure 18. Evaluation du potentiel anti-angiogénique du cyclo-VEGI par test de migration <i>wounding assay</i> de cellules BAE .....	66
Figure 19. Test de migration en chambre de Boyden.....	67
Figure 20. Formation de tubes sur Matrigel® .....	69
Figure 21. Croissance de vaisseaux à partir d'une aorte .....	70
Figure 22. Test de la membrane chorioallantoïde (CAM).....	71
Figure 23. Angiogenèse induite dans la cornée de souris par le FGFb .....	72
Figure 24. Chambre transparente implantée au niveau du dos d'une souris .....	73
Figure 25. Chambre transparente implantée au niveau du crâne d'une souris .....	73
Figure 26. Modèle Angiomouse®.....	75
Figure 27. Gliomes humains U87-RFP implantés en orthotopique dans le cerveau de souris <i>nude</i> .....	76
Figure 28. Illustration du phénomène de <i>Laser speckle</i> .....	80

## Partie IV: Résultats

Figure 29. Structure chimique des molécules TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR.....	87
Figure 30. Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide.....	90
Figure 31. Profils chromatographiques de ATWLPPR, Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-ATWLPPR avant purifications.....	96
Figure 32. Spectres de masse MALDI-TOF de ATWLPPR et TPC-Ahx-ATWLPPR, après purifications.....	97
Figure 33. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol.....	98
Figure 34. Spectres d'excitation biphotonique de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol.....	99
Figure 35. Analyse de l'expression protéique de la NRP-1 de 3 lignées cellulaires (U87, HUVEC et A549) par Western blot.....	119
Figure 36. Quantités de TPC-Ahx-ATWLPPR ou de produits photoactivables totaux (TPC-Ahx-ATWLPPR et produit de dégradation) présentes dans les tissus.....	123
Figure 37. Etude du chemin optimal pour les réponses $V_{14}/V_0$ , $V_{21}/V_0$ et $V_{28}/V_0$ .....	134
Figure 38. Courbes d'isoreponses de $V_{14}/V_0$ , pour irradiance fixée à $95 \text{ mW/cm}^2$ , en fonction des valeurs de dose de PS et de fluence.....	135
Figure 39. Dispositif d'acquisition du système OxyLite®/ OxyFlo®.....	138
Figure 40. Variations du flux et de la température intratumorales chez deux souris, pendant et après PDT avec TPC.....	144
Figure 41. Variations du flux et de la température intratumorales chez deux souris, pendant et après PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR.....	144
Figure 42. Marquage immunohistochimique des vaisseaux d'une tumeur U87 témoin, non traitée, et de tumeurs U87 traitées par PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR, 24h après traitement.....	147
Figure 43. Colorations HES d'une tumeur U87 témoin, non traitée et d'une tumeur U87 traitée par PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR, 24h après traitement.....	148
Figure 44. Evolution du volume tumoral médian des tumeurs U87 xénotransplantées chez la souris <i>nude</i> , après PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR.....	149
Figure 45. Représentations de Kaplan-Meier de la croissance tumorale des tumeurs U87 après PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR.....	150



## LISTE DES ABREVIATIONS

A	Alanine (Ala)
Ahx	Acide <b>amino</b> hexanoïque
ALA	Acide 5- <b>amino</b> lévulinique
AMM	Autorisation de <b>mise</b> sur le <b>marché</b>
ANET	<i>Anti-<b>ne</b>ovascular <b>therapy</b></i>
Ang-1 &2	<b>Angi</b> opoiétine-1 et -2
ARNm	ARN (acide ribonucléique) <b>m</b> essenger
BAE	<i><b>B</b>ovine <b>A</b>ortic <b>E</b>ndothelial cells</i>
Boc	<i>tertio-<b>butyloxy</b>carbonyle</i>
BPD-MA	<i><b>B</b>enzoporphyrine <b>d</b>erivative <b>m</b>onoacid ring <b>A</b></i>
BSA	Albumine <b>b</b> ovine sérique
C	Cystéine (Cys)
CAM	<i><b>Ch</b>orio<b>all</b>antoic <b>m</b>embrane</i>
CI	Conversion <b>i</b> nterne
CIS	Conversion <b>i</b> nter-systèmes
CML	Cellule <b>m</b> usculaire lisse
COX	<b>Cyclo</b> oxygénase
cPLA2	<i><b>C</b>ytosolic <b>ph</b>ospholipase <b>A</b>2</i>
D	Acide aspartique (Asp)
DIEA	<b>Di</b> isopropyl-éthyl-amine
DMF	<b>Di</b> méthylformamide
DMLA	<b>D</b> égénérescence <b>m</b> aculaire liée à l' <b>â</b> ge
DMSO	<b>Di</b> méthylsulfoxyde
E	Acide glutamique (Glu)
E	Jour <b>e</b> mbryonnaire (à partir de la fécondation)
EDTA	Acide éthylène <b>d</b> iamine <b>t</b> étraacétique
EGF	Facteur de croissance épidermique ( <i>epidermal growth factor</i> )
EGFR	<b>R</b> écepteur à l'EGF
ELISA	<i><b>E</b>nzyme <b>l</b>inked <b>i</b>mmunosorbent <b>a</b>ssay</i>
eNOS	<i>endothelial <b>n</b>itric <b>o</b>xide synthase</i>
ERO	<b>E</b> spèces <b>r</b> éactives de l' <b>o</b> xygène
F	Phénylalanine (Phe)
FGFa &b	Facteurs de croissance fibroblastiques ( <i>fibroblast growth factors</i> ) acide & basique
FGFR	<b>R</b> écepteur au FGF
FITC	<b>F</b> luorescéine <b>i</b> sothiocyante
Flk-1	<i><b>F</b>etal <b>l</b>iver <b>k</b>inase-1</i>
Flt-1, 3 &4	<i><b>f</b>ms-like <b>t</b>yrosine <b>k</b>inase-1, -3 et -4</i>
Fmoc	N-(9- <b>f</b> luorényl- <b>m</b> éthoxycarbonyl)
G	Glycine (Gly)
G-CSF	<i><b>G</b>ranulocyte <b>c</b>olony-<b>s</b>timulating <b>f</b>actor</i>
GFP	<i><b>G</b>reen <b>f</b>luorescent <b>p</b>rotein</i>

GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
H	Histidine (His)
HES	<b>H</b> ématoxyline éosine safran
HF	Facteur <b>h</b> ypotensif
HGF/SF	<i>Hepatocyte growth factor/ scatter factor</i>
HIF-1	<b>H</b> ypoxia-inducible factor-1
HOBt	<b>H</b> ydroxybenzotriazole
HpD	<b>H</b> ématoporphyrine <b>d</b> érivée
HSP27	<i>Heatshock protein 27</i>
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cell</i>
I	Isoleucine (Ile)
IC <sub>50</sub>	Concentration conduisant à <b>50%</b> d'inhibition ou d'antagonisme
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
ICPP	<i>Increasing capillary permeability protein</i>
IDL	Intervalle <b>d</b> rogue-lumière
Ig	<b>I</b> mmunoglobuline
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL	<b>I</b> nterleukine
IP <sub>3</sub>	<b>I</b> nositol(1,4,5)-triphosphate
IRM	<b>I</b> magerie par résonance <b>m</b> agnétique
i.v.	<b>I</b> ntraveineuse
K	Lysine (Lys)
K <sub>d</sub>	Constante de <b>d</b> issociation
KDR	<i>Kinase insert domain-containing receptor</i>
L	Leucine (Leu)
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
M	Méthionine (Met)
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MAPKAP 2/3	<i>MAPK-activating protein kinase-2 et 3</i>
MAPK/ERK1/2	<i>Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2</i>
MEC	<b>M</b> atrice <b>e</b> xtracellulaire
MMP	<i>Matrix metallo proteinase</i>
MMPI	<b>I</b> nhibiteur synthétique de MMP
mTHPC	<b>M</b> éso-tétrahydroxyphényl <b>c</b> hlorine
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl <b>t</b> étrazolium
N	Asparagine (Asn)
NIP	<i>NRP-1-Interacting Protein</i>
NO	<b>O</b> xyde <b>n</b> itrique
NRP-1 &2	<b>N</b> europiline-1 et-2
P	Proline (Pro)
PAI	<i>Plasminogen activator inhibitor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBST	<i>PBS Tween 20</i>
PD-ECGF/TP	<i>Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase</i>

PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PDT	Thérapie <b>photodynamique</b>
PDZ	<b>PSD-95/Dlg/ZO-1</b>
PEG 400	<b>Polyéthylène glycol 400</b>
PF-4	<b>Facteur plaquettaire-4</b>
p.i.	<b>post-injection</b>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PIP <sub>3</sub>	<i>Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate</i>
PLC-γ	<b>Phospholipase C-γ</b>
PIGF	<i>Placental growth factor</i>
PMSF	<i>Phenylmethylsulphonyl fluoride</i>
pO <sub>2</sub>	Pression partielle en oxygène
PpIX	<b>Protoporphyrine IX</b>
PS	<b>Photosensibilisateur</b>
PTEN	<i>Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN</i>
PVA	<b>Alcool polyvinylique</b>
pVHL	<b>protéine von Hippel-Lindau</b>
Q	Glutamine (Gln)
R	Arginine (Arg)
RMN	<b>Résonance magnétique nucléaire</b>
RPE	<b>Résonance paramagnétique électronique</b>
S	Sérine (Ser)
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
Sck	<i>Shc-like</i> protéine
SEMA	<b>Sémaphorine</b>
SH2	<i>Src homology-2</i>
SPK	<i>Sphingosine kinase</i>
T	Thréonine (Thr)
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween 20</i>
TBTU	Trifluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium)
TFA	Acide <b>trifluoroacétique</b>
TGFα & β	<i>Transforming growth factor</i> α et β
Tie2/Tek	<i>Tunica internal endothelial cell kinase</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TK	<i>Tyrosine kinase</i>
TNFα	<i>Tumor necrosis factor</i> α
tPA	Activateur du <b>plasminogène</b> de type <b>tissulaire</b>
TPC	5-(4-carboxyphényl)- 10,15,20- <b>triphényl-chlorine</b>
TSP-1	<b>Thrombospondine-1</b>
Tx	<b>Thromboxane</b>
uPA	Activateur du <b>plasminogène</b> de type <b>urokinase</b>
V	Valine (Val)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF/VPF	<i>Vascular endothelial growth factor/ Vascular permeability factor</i>

VEGFR-1, 2 &3	<b>R</b> écepteurs au VEGF de type 1, 2 et 3
VEGI	<i>V</i> ascular <i>e</i> ndothelial <i>g</i> rowth <i>i</i> nhibitor
VRAP	<b>VEGFR-associated protein</b>
W	Tryptophane (Trp)
Y	Tyrosine (Tyr)

# I INTRODUCTION GENERALE

Les tumeurs requièrent pour leur croissance un **approvisionnement en nutriments et en oxygène** ; les métabolites toxiques qu'elles produisent doivent quant à eux être éliminés rapidement. Or, pour des tailles tumorales supérieures à quelques mm<sup>3</sup>, les processus de diffusion de l'oxygène depuis les vaisseaux sanguins jusqu'aux cellules tumorales deviennent insuffisants.

L'**hypoxie** intratumorale qui en résulte va induire la sécrétion par les cellules cancéreuses de facteurs de croissance, dont le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) est le chef de file. En se liant à ses récepteurs situés essentiellement au niveau des cellules endothéliales activées bordant les vaisseaux sanguins à proximité des tumeurs, le **VEGF** va déclencher des cascades de signalisations intracellulaires conduisant à la création d'un nouveau réseau vasculaire qui pourra assurer ces fonctions d'approvisionnement et d'élimination. Cette formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants est appelée **angiogenèse**.

Une voie thérapeutique relativement nouvelle dans l'arsenal anticancéreux consiste à inhiber le processus d'angiogenèse (**thérapie anti-angiogénique**) ou à détruire les vaisseaux nouvellement formés (**thérapie anti-néovasculaire**), afin d'asphyxier la tumeur et de la faire régresser.

La **thérapie photodynamique** (PDT) peut être utilisée pour traiter certaines petites tumeurs localisées, et représente une alternative par rapport à la chimiothérapie ou la radiothérapie. Son principe repose sur l'activation par la **lumière** d'un **photosensibilisateur** (PS), non toxique à l'obscurité, localisé au niveau du site tumoral. Le traitement par PDT comporte deux étapes. La première étape consiste à injecter au patient le PS, qui, idéalement, va se fixer de façon spécifique dans les tissus néoplasiques. La deuxième étape est la transformation de ce PS en une molécule cytotoxique suite à une irradiation lumineuse de longueur d'onde appropriée, qui, en présence d'**oxygène**, va induire des réactions photochimiques conduisant à l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène hautement cytotoxiques, qui vont produire une destruction tissulaire spécifique et localisée.

Si la destruction tumorale peut résulter de dommages cytotoxiques directs au niveau des cellules cancéreuses ayant accumulé le PS, d'autres mécanismes, indirects, semblent jouer

un rôle crucial. Il s'agit notamment de l'**effet anti-vasculaire**, caractérisé par l'altération du réseau vasculaire de la tumeur aboutissant à l'arrêt du flux sanguin, et de l'activation du système immunitaire liée à une réponse inflammatoire provoquée par la libération de médiateurs par les cellules lésées. De nombreuses études tendent à montrer le rôle prépondérant joué par l'effet anti-vasculaire dans l'éradication tumorale par PDT. Une accumulation accrue et plus sélective des PS au niveau des néovaisseaux tumoraux pourrait favoriser cet effet anti-vasculaire, et donc l'efficacité du traitement.

Ce manuscrit comprend, dans une première partie, une **synthèse bibliographique** sur le processus angiogénique et le rôle essentiel qu'y jouent le VEGF et ses récepteurs. L'accent y est également mis sur la PDT en tant que thérapie anti-vasculaire et sur les modèles permettant d'en évaluer les dommages.

Dans un deuxième temps, nous présenterons la conception et la synthèse d'un nouveau PS ciblant les cellules endothéliales angiogéniques, par couplage à un peptide spécifique de récepteurs au VEGF. Les **résultats expérimentaux** de l'étude *in vitro* et de l'étude *in vivo*, visant à valider notre stratégie, y seront détaillés.

Une **conclusion générale** dégagera les principaux résultats issus de ce travail de recherche et les perspectives à court et moyen terme, dans lesquelles les améliorations possibles quant à la structure de la molécule seront notamment discutées.

## II SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### II.1 LA NEOVASCULARISATION DANS LE PROCESSUS DE DEVELOPPEMENT TUMORAL

#### II.1.1 Le processus de cancérisation

Le cancer correspond à la multiplication anarchique de certaines cellules normales de l'organisme, qui échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de leur multiplication. En outre, ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, en le détruisant, puis de migrer à distance pour former des métastases.

La carcinogenèse est un processus séquentiel qui fait intervenir l'accumulation progressive de mutations génétiques, après exposition à un(des) carcinogène(s), d'origine chimique, physique ou virale, conduisant à l'activation de certains oncogènes et/ou l'inactivation de certains gènes suppresseurs de tumeurs (étapes d'**initiation** et de **promotion** du cancer) <sup>(1)</sup>. En parallèle à ces changements génétiques, les cellules cancéreuses induisent des changements profonds dans le tissu voisin normal (étape de **progression**). Ce tissu ainsi altéré, qu'on appelle également le stroma tumoral, offre un environnement favorable qui permet la croissance de la tumeur, l'invasion locale et la progression métastatique, qui est à l'origine de la majorité des décès par cancer.

La **formation de nouveaux vaisseaux sanguins** dans le stroma tumoral est un événement décisif qui favorise la progression tumorale (par approvisionnement de la tumeur en oxygène et nutriments, et élimination de ses déchets) et la dissémination des métastases, en augmentant la probabilité que les cellules cancéreuses puissent entrer dans la circulation sanguine, et atteindre d'autres organes.

#### II.1.2 Les vaisseaux sanguins

Le sang joue plusieurs rôles, parmi lesquels le transport d'oxygène et de nutriments aux tissus et l'élimination de leurs déchets, l'homéostasie et la défense de l'organisme. Il est

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

composé d'une phase liquide, le **plasma** (le sérum en est la version défibrinée, après coagulation) et d'éléments figurés :

- les **érythrocytes** (ou hématies ou globules rouges) (99% des éléments figurés), qui assurent le transport de l'oxygène ;
- les **leucocytes** (ou globules blancs), impliqués dans les réactions immunitaires, *e.g.* granulocytes ou polynucléaires (neutrophiles, éosinophiles et basophiles), lymphocytes (B et T) et monocytes (pouvant se différencier en macrophages dans les tissus) ;
- et, les **thrombocytes** (ou plaquettes sanguines), impliqués dans la coagulation du sang.

Les vaisseaux sanguins permettent de transporter ces différents éléments à travers l'organisme. On peut distinguer dans le système vasculaire le réseau artériel qui part du cœur vers les organes et le réseau veineux qui ramène le sang au cœur. Les capillaires constituent le lien entre ces deux systèmes. Les systèmes artériels et veineux sont composés de différents types de vaisseaux selon leur taille et leurs fonctions (*Tableau 1*).

**Tableau 1. Caractéristiques des différents vaisseaux sanguins chez l'homme.**

	Diamètre du lumen	Épaisseur de la paroi	Cellules musculaires lisses	Composition de la matrice extracellulaire	
				Elastine	Collagène
<b>Artères</b>	4 mm	1 mm	+++	++	I, III
<b>Artérioles</b>	30 µm	6 µm	+	+/-	I, III
<b>Capillaires</b>	8 µm	1 µm	0	0	IV, V
<b>Veinules</b>	20 µm	1 µm	0	+/-	
<b>Veines</b>	5 mm	0,5 mm	+	+/-	

La paroi interne de tous les vaisseaux sanguins est constituée d'une monocouche de **cellules endothéliales** (*intima* des vaisseaux), en contact direct avec le sang <sup>(2, 3)</sup>. Ces cellules reposent sur une **membrane basale**, type de matrice extracellulaire (MEC) d'une épaisseur de 50 à 800 nm, qui les sépare du tissu conjonctif sous-jacent. La membrane basale est formée de l'union de deux feuillets : une lame basale (mince feuillet de glycoprotéines sécrétées par les cellules endothéliales) et une lame réticulaire (feuillet de matériel extracellulaire sécrété par les cellules du tissu conjonctif). La lame basale est elle-même composée d'une couche dense ou *lamina densa* (constituée de collagène IV pour les capillaires), entre deux couches claires (*lamina lucida*) contenant de la laminine. La lame réticulaire, quant à elle, est notamment constituée de fibronectine.



## Partie II : Synthèse bibliographique

Des **cellules musculaires lisses** (CML) (constituants principaux de la *media* des vaisseaux) entrent dans la composition des artères, artérioles, veines et veinules, mais pas dans celle des capillaires. Elles servent à réguler le flux et la perméabilité vasculaires, en permettant la vasoconstriction. Les **péricytes**, qui, dans certains capillaires, entourent les cellules endothéliales en étant logés dans un dédoublement de la membrane basale (*Figure 1*), ont des caractéristiques qui les rapprochent des CML. Il s'agit de cellules mésenchymateuses-*like*, indifférenciées, servant de support aux vaisseaux.

La formation de nouveaux vaisseaux par angiogenèse implique principalement les capillaires, très fins vaisseaux d'environ 5 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre, constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales avec une lame basale et quelques fibres de collagène, mais ne possédant pas de CML (*Figure 1*).

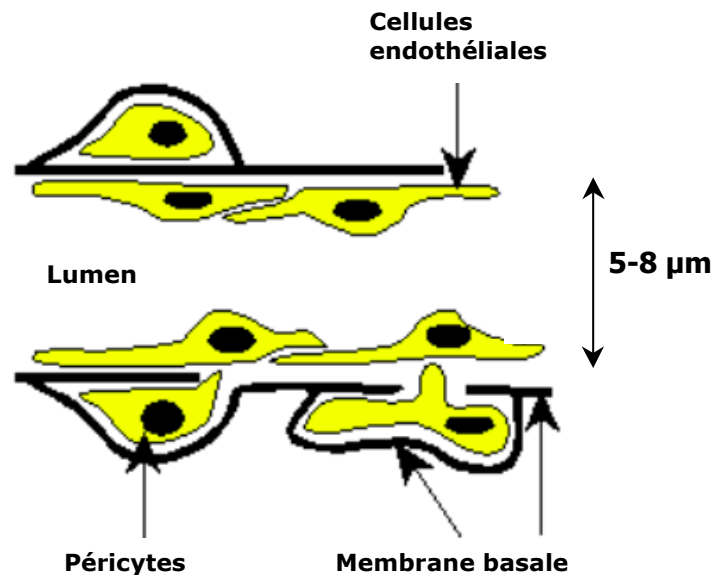


Figure 1. Schéma d'un capillaire sanguin. Dans les capillaires matures, la paroi du vaisseau est bordée de cellules endothéliales, d'une membrane basale (matrice extracellulaire particulière qu'on trouve à l'interface entre un épithélium et un autre tissu), et d'une couche de cellules appelées péricytes, qui entourent partiellement l'endothélium.

### II.1.3 Les différents processus de formation des néovaisseaux

La formation de vaisseaux sanguins se fait principalement selon deux mécanismes : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

La **vasculogenèse** correspond au processus par lequel des vaisseaux sanguins, constitués essentiellement de cellules endothéliales, sont formés par différenciation de précurseurs mésenchymateux. Les cellules endothéliales et hématopoïétiques dérivent d'un précurseur commun, l'hémangioblaste. Les hémangioblastes s'agglutinent, et les cellules situées à l'intérieur de l'amas deviennent les cellules hématopoïétiques (qui se différencieront en globules rouges, globules blancs et plaquettes), tandis que les cellules en périphérie se différencient en angioblastes, précurseurs des cellules endothéliales. La vasculogenèse contribue pour une grande part à la mise en place de l'appareil cardio-vasculaire et à la formation des réseaux vasculaires propres à chaque organe, au cours du développement embryonnaire.

L'**angiogenèse**, quant à elle, est définie comme la formation de nouveaux capillaires à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle intervient également au cours du développement embryonnaire, et joue ensuite un rôle fondamental chez l'enfant et l'adulte, dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta)<sup>(4)</sup>, la réparation tissulaire (cicatrisation), l'ossification endochondrale<sup>(5)</sup>, la reperméabilisation des thromboses ou encore l'adaptation musculaire à l'exercice physique<sup>(6)</sup>. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques<sup>(7)</sup>. Lorsqu'un dysfonctionnement des mécanismes du contrôle de l'angiogenèse survient, elle peut être impliquée dans le développement et la progression de maladies variées, notamment inflammatoires<sup>(8)</sup>, comme les rétinopathies diabétiques, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les hémangiomes, le sarcome de Kaposi, les glaucomes, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le psoriasis, l'obésité, le cancer<sup>(9)</sup> et la maladie d'Alzheimer<sup>(10)</sup>. Un processus voisin de celui de l'angiogenèse est la lymphangiogenèse, c'est-à-dire le remodelage vasculaire associé à la croissance de vaisseaux lymphatiques. La lymphangiogenèse suscite actuellement un intérêt important de la part des chercheurs<sup>(11-13)</sup>, mais ne fait pas l'objet de ce travail de thèse, et ne sera donc pas détaillée par la suite.

Il est couramment admis que la formation des néovaisseaux tumoraux se fait par angiogenèse. D'autres mécanismes ont cependant été décrits, comme la **cooption vasculaire**<sup>(14, 15)</sup>, phénomène dans lequel les tumeurs utiliseraient les vaisseaux préexistants.

Par ailleurs, dans certains cancers très agressifs, les vaisseaux intratumoraux peuvent être constitués par des cellules tumorales dont le phénotype est de type endothélial

(*vasculogenic mimicry*)<sup>(16)</sup>. Le néovaisseau ainsi formé peut être totalement bordé par ces cellules tumorales différenciées en cellules endothéliales ou être une mosaïque de ces cellules tumorales et de cellules endothéliales normales<sup>(15, 17)</sup>.

Des progéniteurs des cellules vasculaires issues de la moelle osseuse ont été retrouvés à l'état circulant dans le sang chez l'adulte<sup>(18)</sup>. Ces **cellules endothéliales progénitrices** peuvent s'incorporer dans les sites d'angiogenèse et contribuer à l'augmentation de la néovascularisation, probablement par une différenciation *in situ* en des cellules endothéliales matures<sup>(19, 20)</sup>, mais ce processus ne semble pas contribuer à l'angiogenèse tumorale<sup>(21)</sup>.

Si l'implication de ces phénomènes dans le processus de néovascularisation tumorale ne doit pas être négligée, l'angiogenèse semble encore aujourd'hui jouer un rôle central dans la formation des néovaisseaux tumoraux.

### II.1.4 L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse peut se faire par bourgeonnement (*sprouting*) ou par intussusception (élargissement et séparation de vaisseaux déjà formés)<sup>(22)</sup>. Nous détaillons ici l'angiogenèse par bourgeonnement, qui est la plus largement décrite.

A l'échelle tissulaire, les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques, quel que soit le stimulus physiologique ou pathologique initial<sup>(23)</sup> ; seuls les mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent être légèrement différents.

Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire, qui interagissent pour former des néovaisseaux. Les cellules endothéliales capillaires<sup>(23)</sup> sont les principaux acteurs de ce mécanisme, mais les autres composants des vaisseaux tels que les péricytes ou la MEC interviennent également<sup>(24)</sup>.

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inférieure à 1-2 mm<sup>3</sup>, est indépendante de l'angiogenèse et l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple<sup>(25)</sup>. On parle de **phase dormante** ou **avasculaire**. Sous l'effet de l'accumulation d'altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales

devient plus active. La croissance tumorale ralentit, du fait d'un équilibre entre prolifération et mortalité cellulaires. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. Dans les tissus, on estime que la limite de diffusion de l'oxygène correspond à une distance de 100-150  $\mu\text{m}$  entre le capillaire et les cellules, ce qui correspond à environ 3-5 couches de cellules autour d'un vaisseau. Les carcinomes *in situ* peuvent rester à l'état dormant pendant plusieurs années, mais ils peuvent également acquérir un phénotype angiogénique. Ce **switch angiogénique** résulte de la rupture de l'équilibre préexistant entre facteurs anti- et pro-angiogéniques. Les facteurs pro-angiogéniques sont en excès par rapport aux agents anti-angiogéniques, ce qui va déclencher l'angiogenèse tumorale <sup>(26)</sup>, qui peut se décomposer en plusieurs étapes.

### ▪ Etape 1 : Initiation de l'angiogenèse

L'**hypoxie** intratumorale induite par la forte prolifération des cellules cancéreuses semble être le principal initiateur de l'angiogenèse. Elle peut induire la sur-expression de gènes angiogéniques <sup>(27, 28)</sup>, et va notamment stabiliser la sous-unité HIF-1 $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor-1*), qui va induire l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (**VEGF**), par les cellules tumorales ou stromales. En parallèle, se produit une activation des cellules endothéliales par induction de l'expression de récepteurs aux facteurs de croissance pro-angiogéniques. L'hypoxie représente également un stimulus attracteur vis-à-vis des macrophages ; ceux-ci vont produire des protéases facilitant la migration des cellules endothéliales. Par ailleurs, de nombreux oncogènes induisent la sur-expression de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF, IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), et le TGF $\alpha$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$* ), et de cytokines et d'enzymes protéolytiques.

### ▪ Etape 2 : Dégradation de la membrane basale

Les péricytes se détachent et les jonctions entre cellules endothéliales sont altérées. Le plasminogène extravasé dans le milieu périvasculaire est transformé en plasmine sous l'action des activateurs du plasminogène : l'urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). La plasmine active ensuite des métalloprotéinases (MMPs, *matrix metallo proteinases*, notamment MMP-2 et MMP-9), endopeptidases zinc-dépendantes sécrétées par les cellules

tumorales, stromales et endothéliales. Toutes ces enzymes vont permettre la dégradation de différents composés (laminine, fibrine, fibronectine, élastine, collagène) de la MEC soutenant les vaisseaux <sup>(29)</sup>. Cette dégradation locale de la MEC va permettre aux cellules endothéliales de migrer, et va libérer le facteur de croissance fibroblastique basique (FGFb ou FGF-2), et certaines isoformes du VEGF.

### ▪ Etape 3 : Migration des cellules endothéliales

Libérées de la MEC, les cellules endothéliales vont migrer en direction de la source du stimulus angiogénique (la tumeur), par chimiotactisme. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape sont le FGFb et le VEGF <sup>(2)</sup>. La liaison du VEGF à ses récepteurs exprimés au niveau des cellules endothéliales aboutit à l'activation de ces dernières <sup>(30)</sup>. Les cellules endothéliales synthétisent et sécrètent de nouvelles protéines extracellulaires (fibronectine, ténascine), formant une matrice provisoire qui va faciliter leur migration et les guider vers leur cible. Enfin, pour interagir avec les protéines de leur nouvel environnement, les cellules endothéliales activées expriment de nouveaux récepteurs à la MEC, notamment ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), les sélectines E et P ou encore les intégrines (*e.g.*  $\alpha_v\beta_3$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ), absentes des cellules endothéliales quiescentes et induites à la surface des cellules endothéliales activées <sup>(23)</sup>.

### ▪ Etape 4 : Prolifération des cellules endothéliales

Sous l'influence du VEGF et du FGFb, les cellules endothéliales vont alors proliférer pour fournir le nombre de cellules nécessaire à la formation de nouveaux vaisseaux.

### ▪ Etape 5 : Remodelage vasculaire

Suite à cette prolifération, les cellules endothéliales se réorganisent en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Afin de stabiliser les néovaisseaux, les cellules endothéliales vont induire la mise en place de la paroi vasculaire, caractérisée par la déposition d'une lame basale riche en laminine et en collagène IV et par l'accolement de péricytes. L'angiopoïétine-1 (Ang-1), sécrétée par les cellules mésenchymateuses, est un agoniste du récepteur Tie2/Tek (*tunica internal endothelial cell kinase*) exprimé à la surface des cellules endothéliales <sup>(9, 23)</sup>. Par l'intermédiaire du PDGF-BB

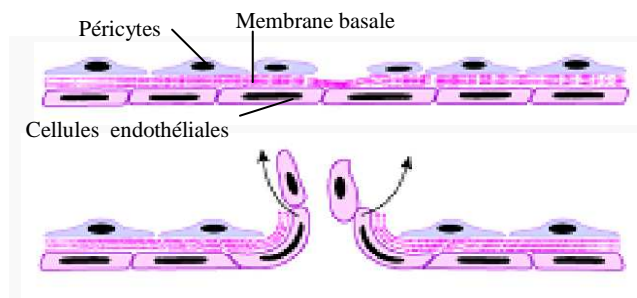
## Partie II : Synthèse bibliographique

(*platelet derived growth factor-BB*), les cellules endothéliales vont recruter les cellules mésenchymateuses qui se différencieront en péricytes<sup>(31)</sup>. Les péricytes, *via* l'action du TGF $\beta$ , bloquent la prolifération des cellules endothéliales, qui forment alors un capillaire mature. Lors de l'angiogenèse tumorale, contrairement à l'angiogenèse physiologique, cette étape n'est cependant pas complètement réalisée.

**Étape 1 :**  
**Initiation**

Sécrétion de **facteurs pro-angiogéniques** (VEGF, FGFb) par les cellules tumorales et les macrophages, induite par l'hypoxie, notamment.

**Étape 2 :**  
**Dégradation de la membrane basale**



Rôle des MMPs, uPA, tPA

**Étape 3 :**  
**Migration des cellules endothéliales**



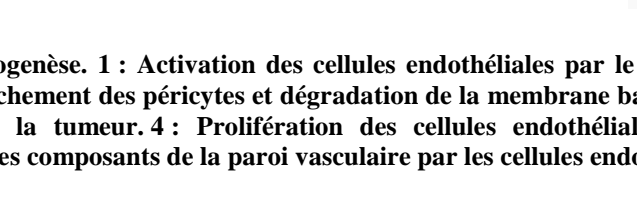
Rôle des MMPs, uPA, tPA, VEGF et VEGFRs

**Étape 4 :**  
**Prolifération des cellules endothéliales**



Rôle du VEGF et VEGFRs

**Étape 5 :**  
**Remodelage vasculaire**



Rôle du PDGF, TGF $\beta$ , Ang-1 et Tie 2

**Figure 2. Etapes de l'angiogenèse. 1 : Activation des cellules endothéliales par le VEGF sécrété par les cellules tumorales. 2 : Détachement des péricytes et dégradation de la membrane basale. 3 : Migration des cellules endothéliales vers la tumeur. 4 : Prolifération des cellules endothéliales. 5 : Formation du néovaisseau, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales.**

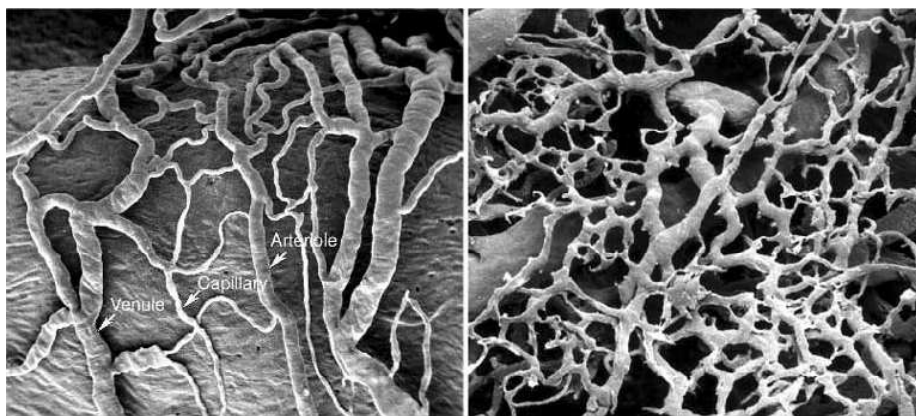
L'angiogenèse va soutenir la croissance de la tumeur en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à son expansion, en produisant des facteurs qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses et en fournissant aux cellules tumorales leur principale voie pour coloniser d'autres organes<sup>(8)</sup>. Ces étapes sont résumées sur la *figure 2*.

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

Les réseaux vasculaires associés aux tumeurs sont différents des réseaux capillaires normaux (*Figure 3*). On retrouve des différences :

- **architecturales** : leur architecture est souvent anarchique et leurs arborisations sont irrégulières. Les réseaux vasculaires sont chaotiques, fragilisés, formés de vaisseaux de diamètre irrégulier, dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération ;
- **histologiques** : leurs parois sont bordées de cellules endothéliales parfois fenêtrées, reposant sur une membrane basale souvent incomplète ou dissociée. La perméabilité vasculaire qui en résulte conduit à de fortes pressions interstitielles <sup>(32)</sup>. Les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales, ce qui explique la fragilité des vaisseaux tumoraux <sup>(33)</sup> ;
- et, **hémodynamiques** : le flux est discontinu ; il peut s'arrêter, voire s'inverser. Les réseaux capillaires associés aux tumeurs sont constamment dépourvus de sphincters précapillaires <sup>(23)</sup>. Malgré la formation de ces néovaisseaux, on peut souvent observer une hypoxie et une nécrose intratumorales.



**Figure 3.** Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux (*vasa vasorum* de sinus carotidien de rat, *gauche*) et tumoraux (xénogreffe de tumeur humaine chez la souris *nude*, *droite*), par microscopie électronique à balayage. Le réseau vasculaire normal présente un agencement clair en artérioles, capillaires et veinules. Au contraire, le réseau vasculaire tumoral est désorganisé ; artérioles, capillaires et veinules ne sont pas clairement identifiables <sup>(34)</sup>.

Par ailleurs, contrairement à l'angiogenèse physiologique, l'angiogenèse tumorale est presque toujours associée à une forte réaction inflammatoire, qui peut également contribuer à la cascade angiogénique <sup>(35)</sup>.

### II.1.5 Les inducteurs et inhibiteurs naturels de l'angiogenèse

Malgré l'abondance de facteurs pro-angiogéniques dans différents tissus, le taux de renouvellement des cellules endothéliales chez un adulte non malade est relativement faible (de l'ordre de 1000 jours). Les cellules endothéliales sont maintenues dans un état de quiescence par la présence concomitante de facteurs anti-angiogéniques endogènes. De plus, inducteurs et inhibiteurs coexistent souvent dans les tissus présentant une angiogenèse consécutive. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'il existe un équilibre naturel entre facteurs pro- et anti-angiogéniques, et que le processus d'angiogenèse résulte d'un déséquilibre entre ces facteurs.

Parmi les **facteurs pro-angiogéniques**, on retrouve essentiellement des facteurs de croissance, qui jouent un rôle essentiel dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales (*Tableau 2*). Ils sont, pour la plupart, sécrétés par les cellules tumorales, mais peuvent aussi l'être par des cellules du stroma, comme les macrophages recrutés sur le site tumoral ou les fibroblastes <sup>(36)</sup>, qui répondent à l'hypoxie en sécrétant des cytokines, comme le VEGF, le FGFb, l'IL-8 (interleukine-8) ou le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ) <sup>(37)</sup>. La MEC est également un réservoir considérable de facteurs régulateurs de l'angiogenèse, comme le VEGF, le FGFb et le TGF $\beta$ , qui peuvent se coupler aux protéoglycanes extracellulaires <sup>(38)</sup>. Le FGFb exerce un puissant effet mitogène et chimioattracteur des cellules endothéliales, fibroblastiques et musculaires lisses des vaisseaux ; il peut également induire la production de diverses protéases (*e.g.* activateurs du plasminogène) et l'expression des intégrines  $\alpha_v$  <sup>(23)</sup>.

Les principaux **facteurs anti-angiogéniques** sont présentés dans le *tableau 3*. Ils agissent sur les cellules endothéliales en inhibant leur migration, leur prolifération et/ou leur capacité à former des capillaires fonctionnels. Certains de ces inhibiteurs endogènes sont des fragments issus de la protéolyse de grosses protéines, comme l'angiostatine (fragment du plasminogène) <sup>(39, 40)</sup> ou l'endostatine (issue du collagène XVIII) <sup>(41)</sup>. Les PAIs (*plasminogen activator inhibitors*) sont des inhibiteurs endogènes de uPA et tPA ; les TIMP-1, -2, -3, and -4 (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) inhibent les MMPs <sup>(42)</sup>. Le rôle de l'angiopoïétine-2 (Ang-2) est en revanche plus ambigu. Ang-2 agit comme un antagoniste de Ang-1 en bloquant la phosphorylation de Tie2 induite par Ang-1 <sup>(31)</sup>. Si, en l'absence de facteurs pro-



## **Partie II : Synthèse bibliographique**

---

angiogéniques, comme le VEGF, la déstabilisation de la structure des capillaires qui en résulte conduit à une régression des capillaires, elle permettrait au contraire, en leur présence, l'induction de l'angiogenèse.

Le VEGF et le FGFb sont considérés comme les principaux facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la prolifération des cellules endothéliales. Néanmoins, contrairement au FGFb, qui est un facteur de croissance pleïotropique impliqué dans un grand nombre d'effets biologiques, le VEGF est relativement spécifique des cellules endothéliales.

## Partie II : Synthèse bibliographique

**Tableau 2. Les principaux facteurs pro-angiogéniques** (adapté d'après <sup>(23, 43, 44)</sup>).

	Induction de la prolifération des cellules endothéliales	Induction de la migration des cellules endothéliales	Induction de la différenciation des cellules endothéliales
<b>Facteurs de croissance</b>			
VEGF*	+	+	+
PlGF*	±	+	?
FGFa (FGF-1), FGFb(FGF-2)*	+	+	+
PDGF*	+	+	+
HGF/SF*	+	+	+
TGF $\alpha$ *	+	+	+
TGF $\beta$ *	-	0	+
EGF*	+	+	+
IGF-1*	+	+	+
<b>Médiateurs de l'inflammation</b>			
TNF $\alpha$ *	-	0	+
Interleukine -8	+	+	?
Interleukine -3	+	+	+
Prostaglandines E1, E2	0	0	+
<b>Enzymes</b>			
PD-ECGF/TP*	0	+	?
Cyclooxygénase-2	0	+	+
Angiogénine	0	+	+
<b>Facteurs hématopoïétiques</b>			
Erythropoïétine	+	?	+
G-CSF*	+	+	?
GM-CSF*	+	+	?
<b>Molécules d'adhésion</b>			
VCAM-1*	0	+	?
Sélectine-E	0	+	+
<b>Autre</b>			
Angiopoïétine- 1	0	+	+

\* Voir liste des abréviations.

**Tableau 3. Les principaux facteurs anti-angiogéniques** <sup>(23)</sup>.

Inhibiteur	Mécanisme d'action
<b>Fragments protéiques</b>	
Angiostatine (fragment du plasminogène)	↓ prolifération, ↑ apoptose des cellules endothéliales (CE)
Endostatine (fragment du collagène XVIII)	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Fragment de l'anti-thrombine III	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Prolactine 16 kDa	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb*
<b>Médiateurs solubles</b>	
Thrombospondine-1	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE
Troponine-1	↓ prolifération CE
Interféron $\alpha$	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb*
Interféron $\gamma$	↓ prolifération CE
Facteur plaquettaire-4 (PF-4)	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb et l'interleukine-8
Interleukine -12	↑ Interféron- $\gamma$
Interleukine -4	↓ migration CE
Inhibiteur du VEGF* (VEGI)	↓ prolifération CE
TIMP*	↓ activité MMP*
PAI*	↓ activité uPA*
Acide rétinoïque	↓ migration CE
Angiopoïétine-2	↓ maturation des vaisseaux, antagoniste de l'angiopoïétine- 1

\* Voir liste des abréviations.

## II.2 LE FACTEUR DE CROISSANCE ENDOTHELIAL VASCULAIRE (VEGF)

### II.2.1 Le VEGF et la famille du VEGF

#### II.2.1.1 Le VEGF (ou VEGF-A)

##### II.2.1.1.1 Rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique et pathologique

Le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) ou VEGF-A est également connu sous le nom de VPF (*Vascular Permeability Factor*) ou vasculotropine. En effet, Senger *et al* furent les premiers à en présenter la capacité d'induction de la perméabilisation vasculaire, en 1983, et appelèrent cette molécule alors non identifiée «*tumor vascular permeability factor*»<sup>(45)</sup>. En 1989, Ferrara et Henzel rapportèrent l'isolation d'un mitogène spécifique des cellules endothéliales, qu'ils appelèrent «*Vascular Endothelial Growth Factor*»<sup>(46)</sup>. Cette même année, il fut démontré que le VEGF et le VPF étaient en fait la même molécule<sup>(47, 48)</sup>.

Le VEGF joue un rôle central dans l'angiogenèse physiologique, non seulement au cours du développement embryonnaire, mais également chez l'adulte.

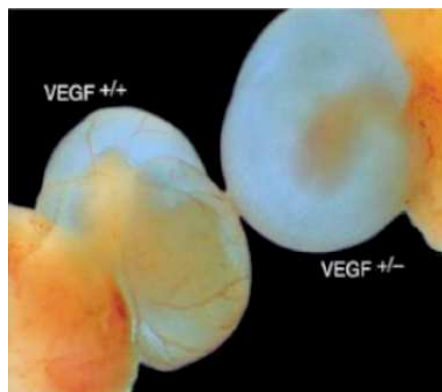


Figure 4. Sac vitellin chez des embryons de souris E10,5 VEGF<sup>+/+</sup> ou VEGF<sup>+/-</sup> (49). Il n'existe pas de réseau vasculaire apparent chez les embryons hétérozygotes, non viables.

Si l'inactivation d'un seul des allèles du VEGF induit une létalité embryonnaire chez la souris entre les jours embryonnaires 9,5 et 11 (E9,5 et E11)<sup>(49, 50)</sup>, une sur-expression du VEGF (d'un facteur 2 par rapport aux taux endogènes) chez des souris transgéniques conduit, quant à elle, à des anomalies sévères du développement cardiaque et à la mort à E12,5-E14.

Ceci démontre clairement la nécessité d'une régulation très fine de la concentration de VEGF pour un **développement embryonnaire** normal <sup>(51)</sup>.

Malgré ses fonctions plus restreintes **chez l'adulte**, le VEGF joue également un rôle important lors de certains processus : il a été détecté lors de la formation du corps jaune, de la croissance des vaisseaux de l'endomètre dans l'utérus, sur le site d'implantation de l'embryon et lors de la cicatrisation <sup>(20, 52-54)</sup>. Le VEGF est également nécessaire lors de l'ossification endochondrale : les chondrocytes issus des cellules mésenchymateuses produisent du VEGF, attracteur des vaisseaux sanguins <sup>(55)</sup>.

L'expression du VEGF par les **cellules tumorales** est corrélée avec la densité microvasculaire de la tumeur, son pouvoir métastasant, et est associée à un mauvais pronostic dans de nombreux types de tumeurs solides et hématologiques <sup>(56)</sup>. Le rôle crucial du VEGF dans la néo-angiogenèse est illustré par les études de modèles tumoraux employant des anticorps neutralisant le VEGF qui préviennent la néovascularisation et ainsi inhibent la croissance tumorale et les métastases <sup>(57)</sup>.

### *II.2.1.1.2 Régulation de l'expression du VEGF*

Le VEGF est synthétisé par les cellules tumorales, mais également par les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes T, les CML, les ostéoblastes et divers autres types cellulaires <sup>(45, 48, 52, 58-60)</sup>. L'expression du VEGF est régulée par une variété de stimuli, dont le plus important est l'hypoxie survenant au sein de la tumeur <sup>(61-63)</sup>.

- **Régulation par l'hypoxie**

Des études ont montré des similarités entre les mécanismes conduisant à l'induction du VEGF et celle de l'érythropoïétine, suite à l'exposition à de basses pression partielles en oxygène (pO<sub>2</sub>) <sup>(63)</sup>. Ces mécanismes font intervenir le facteur de transcription HIF-1. Il s'agit d'un hétérodimère composé de deux sous-unités : la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et la sous-unité HIF-1 $\beta$  (ou ARNT1, pour *arylhydrocarbon receptor nuclear translocator-1*), dont le rôle en tant que médiateur-clé des réponses à l'hypoxie est clairement établi <sup>(64)</sup>. La sous-unité HIF-1 $\beta$  est

présente de façon constitutive dans le noyau des cellules. Au contraire, les taux de HIF-1 $\alpha$  sont, en conditions normoxiques, très faibles, du fait d'une dégradation rapide faisant intervenir des étapes d'hydroxylations par des prolyl-hydroxylases, la protéine von Hippel-Lindau (pVHL) et le protéasome <sup>(65)</sup>.

Des conditions hypoxiques limitent l'hydroxylation de HIF-1 $\alpha$ , ce qui diminue la fixation de pVHL sur celle-ci, et empêche le protéasome de dégrader HIF-1 $\alpha$ . La translocation dans le noyau de HIF-1 $\alpha$  qui s'ensuit va permettre son association avec la sous-unité HIF-1 $\beta$ , et le facteur de transcription HIF-1 ainsi formé va se fixer sur des séquences *enhancer* du gène codant pour le VEGF et en permettre la transcription.

A noter que la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  peut également être induite en conditions normoxiques, par un mécanisme faisant intervenir la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt et le gène suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN*) <sup>(65)</sup>.

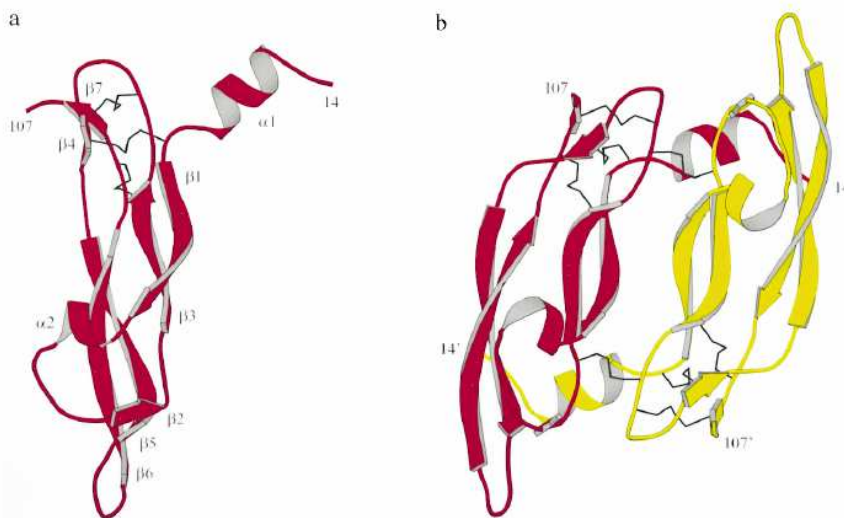
De plus, la sur-expression du VEGF induite par l'hypoxie résulte non seulement d'une activité transcriptionnelle accrue, mais également d'une stabilisation importante de l'ARNm qui est synthétisé ; en conditions normoxiques, la demi-vie de l'ARNm du VEGF est de 30-45 min, alors qu'elle est augmentée jusqu'à 6 à 8 heures dans des cellules en conditions hypoxiques <sup>(66)</sup>.

- **Facteurs de croissance, cytokines, hormones et oncogènes**

Certains facteurs de croissance peuvent également induire la synthèse du VEGF, comme l'EGF (*epidermal growth factor*), le TGF $\alpha$  et le TGF $\beta$ , l'IGF-1, le FGFb ou encore le PDGF <sup>(62, 67-70)</sup>. Des cytokines inflammatoires (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) peuvent aussi induire cette expression dans plusieurs types cellulaires, notamment les fibroblastes et les CML <sup>(71-73)</sup>. Certaines hormones sont également des régulateurs importants de l'expression du VEGF dans divers types cellulaires ; il s'agit notamment de la thyroïdostimuline <sup>(74)</sup>, de la corticotropine <sup>(75)</sup>, des gonadotropines <sup>(76)</sup>, des oestrogènes <sup>(77, 78)</sup> et de la progestérone <sup>(79)</sup>. Enfin, des mutations au niveau de ras <sup>(80)</sup> et de la voie de signalisation Wnt <sup>(81)</sup> semblent jouer un rôle dans l'expression du VEGF.

### II.2.1.1.3 Structure et isoformes du VEGF

Structurellement, le VEGF appartient à la super-famille de gènes du PDGF (il partage 18% d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés avec le PDGF-B) <sup>(82)</sup>, dont les produits sont caractérisés par huit résidus cystéine formant des ponts disulfures <sup>(20)</sup>. Six de ces résidus sont impliqués dans la formation de trois liaisons intramoléculaires (*Figure 5a*), les deux autres sont à l'origine de la formation de deux liaisons disulfures entre deux monomères de VEGF (*Figure 5b*), aboutissant à la formation du VEGF homodimère <sup>(83)</sup>.



**Figure 5.** Représentation en hélice  $\alpha$  et feuillet  $\beta$  du VEGF monomère (a) et dimère (b). Les ponts disulfure sont représentés par des traits noirs <sup>(83)</sup>.

Le gène du VEGF humain est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3) <sup>(84)</sup> et organisé en huit exons, séparés par sept introns <sup>(85, 86)</sup>. L'épissage alternatif de son ARNm aboutit à la formation de plusieurs isoformes, les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés (nommés respectivement VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>) (*Figure 6B*). Le VEGF<sub>165</sub> en est la forme la plus abondante <sup>(86)</sup>. Les autres isoformes sont constituées de 148, 162 et 183 acides aminés et un variant du VEGF<sub>165</sub> a récemment été identifié (VEGF<sub>165b</sub>). Il s'agit d'une forme inhibitrice endogène du VEGF, ne comportant pas l'exon 8 (CDKPRR), qui est remplacé par l'exon 8b, appelé également exon 9 (SLTRKD). Le VEGF<sub>165b</sub> diminue la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF. Bien qu'il puisse lier le VEGFR-2 (récepteur au VEGF de type 2) avec la même affinité que le VEGF<sub>165</sub>, il n'induit pas une phosphorylation du récepteur ou l'activation d'une voie de signalisation <sup>(87)</sup> ; l'extrémité C-terminale du VEGF<sub>165</sub> contenue dans l'exon 8 est ainsi nécessaire pour la signalisation mitogénique.

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

Le VEGF<sub>165</sub> est sécrété comme une glycoprotéine homodimérique d'environ 45 kDa, possédant un caractère basique et une affinité modérée pour l'héparine (présente au niveau de la MEC sous forme de protéoglycanes héparane-sulfate), notamment du fait de la présence de 15 acides aminés basiques contenus dans les 44 acides aminés de l'exon 7<sup>(47, 48)</sup>. Le VEGF<sub>121</sub>, qui ne possède ni l'exon 6, ni l'exon 7, ne se lie pas à l'héparine et diffuse librement. A l'opposé, les isoformes VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub> se lient fortement à l'héparine et sont complètement séquestrées dans la MEC<sup>(52)</sup>, d'où elles peuvent être libérées sous forme de fragments solubles par l'héparine et les héparinases, par la plasmine<sup>(88, 89)</sup>, ou encore par certaines MMPs (MMP-3, 7, 9, 12, 19)<sup>(90)</sup>.

Toutes les isoformes du VEGF se lient au récepteur au VEGF de type 1 (VEGFR-1) et au VEGFR-2 (*Tableau 4*, page 21). Des Ala-scan (remplacements successifs d'un acide aminé par un résidu alanine) ont montré que des régions distinctes du VEGF (situées à des endroits opposés sur le monomère) étaient impliquées dans la reconnaissance du VEGF par chacun de ces récepteurs (*Figure 6A*) : Arg(82), Lys(84) et His(86) sont les résidus critiques pour l'interaction avec le VEGFR-2, tandis que Asp(63), Glu(64) et Glu(67) sont requis pour la liaison au VEGFR-1<sup>(83, 91, 92)</sup>. Le VEGF<sub>165</sub> se lie également aux co-récepteurs neuropiline-1 (NRP-1)<sup>(93)</sup> et neuropiline-2 (NRP-2), alors que le VEGF<sub>145</sub> reconnaît seulement la NRP-2<sup>(94)</sup>. En revanche, le VEGF<sub>121</sub>, qui ne possède pas l'exon 7, fortement basique, ne se lie pas aux neuropilines.

Outre ces différentes affinités pour l'héparine et les neuropilines selon l'isoforme du VEGF considérée, ces isoformes présentent des activités différentes *in vivo*. Des souris exprimant uniquement le VEGF<sub>120</sub> (le VEGF murin possède un acide aminé de moins que le VEGF humain), mais ni le VEGF<sub>164</sub> ni le VEGF<sub>188</sub>, présentent une angiogenèse myocardique défectueuse et une cardiomyopathie ischémique<sup>(95)</sup>, conduisant à leur mort dès la naissance (50% des souris), ou dans les deux semaines suivantes (50%). Par ailleurs, des souris VEGF<sup>164/164</sup> présentent une angiogenèse rétinienne normale, alors que des souris VEGF<sup>188/188</sup> présentent un développement veineux normal, mais des défauts de développement artériel dans la rétine<sup>(96)</sup>. L'ensemble de ces études suggère que les différentes isoformes de VEGF jouent des rôles différents dans le développement artériel et l'agencement vasculaire, et que l'isoforme VEGF<sub>164</sub> y joue un rôle central.

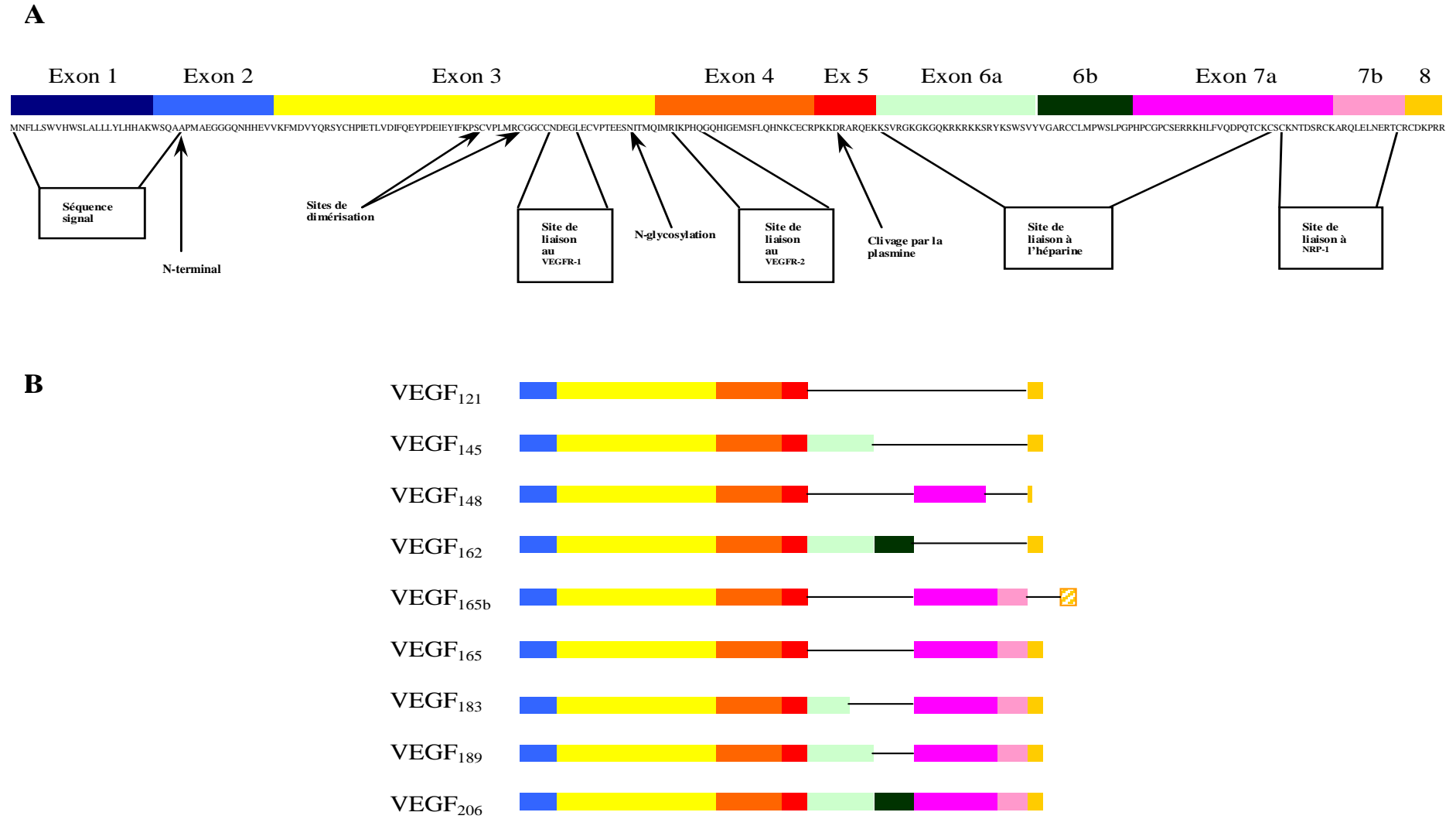


Figure 6. Structure en exons du VEGF. (A) Structure en exons de l'ARNm codant pour le VEGF<sub>206</sub> humain. La séquence en aminoacides correspondante est donnée en dessous de la représentation graphique et les domaines fonctionnels sont indiqués<sup>(97)</sup>. (B) Structure des différentes isoformes du VEGF (VEGF-A), résultant de l'épissage alternatif du gène du VEGF<sub>206</sub><sup>(20)</sup>.



## Partie II : Synthèse bibliographique

Tableau 4. Affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs de cette famille (valeur des constantes de dissociation  $K_d$  en mol/L) <sup>(98)</sup>. Les cases grisées et les signes - indiquent une absence de reconnaissance du récepteur ; les signes + traduisent une liaison au récepteur, sans précision sur l'affinité. N.D. : non déterminé.

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NRP-1	NRP-2	Héparine
VEGF-A <sub>165</sub>				1,8.10 <sup>-10</sup>	1,3.10 <sup>-10</sup>	+
VEGF-A <sub>121</sub>				-	-	-
VEGF-A <sub>145</sub>	1,0.10 <sup>-11</sup>	0,7-7,7.10 <sup>-10</sup>		-	7,0.10 <sup>-10</sup>	+
VEGF-A <sub>189</sub>				+	+	+
VEGF-A <sub>206</sub>				+	+	+
PlGF-1	1,9.10 <sup>-10</sup>			-	-	-
PlGF-2	2,5.10 <sup>-10</sup>			+	+	+
VEGF-B <sub>167</sub>	10 <sup>-11</sup> -10 <sup>-10</sup>			+	N.D.	+
VEGF-B <sub>186</sub>				+		-
VEGF-C (précurseur)		~10 <sup>-8</sup>	~10 <sup>-9</sup>		-	
VEGF-C (clivé)		4,1.10 <sup>-10</sup>	1,4.10 <sup>-10</sup>		+	
VEGF-D (précurseur)		1,6.10 <sup>-5</sup>	8,2.10 <sup>-7</sup>		-	
VEGF-D (clivé)		5,6.10 <sup>-8</sup>	2,0.10 <sup>-8</sup>		+	
VEGF-E		3,3.10 <sup>-10</sup>		A divers degrés pour VEGF-E <sub>NZ-2</sub> , VEGF-E <sub>NZ-10</sub> , VEGF-E <sub>D1701</sub>	N.D.	Selon isoforme
Vammine (VEGF-F1)	-	4,1.10 <sup>-10</sup>			N.D.	+
TfsvVEGF (VEGF-F2)	~ 10 <sup>-11</sup>	10 <sup>-9</sup> - 10 <sup>-8</sup>				+
Pm-VEGF (VEGF-F2)	1,7.10 <sup>-11</sup>	6,5.10 <sup>-9</sup>				N.D.

### II.2.1.2 Les autres membres de la famille du VEGF

A ce jour, six autres protéines de la famille du VEGF ont été identifiées dans différentes espèces.

#### II.2.1.2.1 Le facteur de croissance placentaire (PlGF)

Découvert en 1991 dans le placenta humain <sup>(99)</sup>, le PlGF (*Placental Growth Factor*) forme un homodimère de 46-50 kDa, et partage environ 50% d'homologie avec le VEGF<sub>165</sub> <sup>(99)</sup>. Il a également été détecté dans le cœur, les poumons, la glande thyroïde, le muscle squelettique, dans des lignées de cellules endothéliales, la moelle osseuse et les kératinocytes <sup>(100, 101)</sup>. Il reconnaît VEGFR-1, mais pas VEGFR-2 <sup>(102, 103)</sup>.

Quatre isoformes provenant de l'épissage alternatif de l'ARNm du PlGF sont connues chez l'homme : PlGF-1 (PlGF<sub>131</sub>), PlGF-2 (PlGF<sub>152</sub>), PlGF-3 (PlGF<sub>203</sub>) et PlGF-4 (PlGF<sub>224</sub>) <sup>(104-106)</sup>. Contrairement au PlGF-1 et au PlGF-3, le PlGF-2 peut se lier à l'héparine et

aux co-récepteurs NRP-1 et NRP-2 du fait de la présence d'une séquence fortement basique de 21 acides aminés codés par l'exon 6<sup>(104)</sup>.

Le PlGF peut entrer en compétition avec le VEGF<sub>165</sub> pour la liaison au VEGFR-1<sup>(107)</sup>, ce qui permettrait au VEGF de se lier préférentiellement au VEGFR-2, considéré comme le principal récepteur à l'origine des effets pro-angiogéniques du VEGF. De plus, il existe des hétérodimères de PlGF-VEGF, pouvant induire la formation d'hétérodimères entre VEGFR-1 et VEGFR-2<sup>(108)</sup>. Les effets induits par ces hétérodimères (effets mitogéniques et chimiotactiques sur les cellules endothéliales) sont moins importants que ceux induits par des homodimères de VEGF, mais très supérieurs à ceux d'homodimères du PlGF<sup>(109, 110)</sup>.

### II.2.1.2.2 Le VEGF-B

Le VEGF-B (ou *VEGF-related factor*, VRF) a été cloné et caractérisé en 1996<sup>(111)</sup>. Chez la souris, il existe deux isoformes, générées par épissage alternatif, de 167 et 186 acides aminés (homodimères de 21 et 32 kDa, respectivement), qui peuvent se lier au VEGFR-1, mais pas au VEGFR-2 ni au VEGFR-3 (*Tableau 4*)<sup>(112)</sup>. Contrairement au VEGF-B<sub>167</sub>, le VEGF-B<sub>186</sub> ne se lie pas à l'héparine et peut donc diffuser librement<sup>(113)</sup>. Le VEGF-B<sub>167</sub>, qui se lie à l'héparine, reconnaît également la NRP-1. Pouvant former des homodimères et des hétérodimères avec le VEGF-A, le VEGF-B est très abondant dans le cœur, le muscle squelettique et le pancréas<sup>(112)</sup>.

### II.2.1.2.3 Le VEGF-C et le VEGF-D

Le VEGF-C<sub>389</sub> (ou *VEGF-related protein*, VRP) a été cloné à partir de cellules de cancers humains de la prostate<sup>(114)</sup>. S'il partage environ 30% d'homologie avec le VEGF<sub>165</sub>, il est plus apparenté (60% d'homologie) au VEGF-D<sub>333</sub> (ou *c-fos induced growth factor*, FIGF) de par la présence d'extensions N- et C- terminales, absentes chez les autres membres de la famille du VEGF<sup>(115)</sup>. Tous deux sont synthétisés sous forme d'un précurseur non actif (pré-pro-protéines) qui doit être clivé par protéolyses successives pour donner le *VEGF homology domain* (VHD), présentant une affinité optimale pour les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. Par le VEGFR-2, le VEGF-C joue un rôle dans l'angiogenèse, et, par le VEGFR-3, le VEGF-C et le VEGF-D jouent un rôle important dans la lymphangiogenèse. Le VEGF-C est nécessaire aux étapes initiales de développement lymphatique et la présence des deux allèles est essentielle à un développement lymphatique normal<sup>(116)</sup>. Moins étudié, le VEGF-D induit

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

la formation de réseaux lymphatiques au sein des tumeurs et favorise leurs métastases <sup>(117)</sup>. Le VEGF-C reconnaît également la NRP-2 <sup>(115)</sup> (*Tableau 4*, page 21). Son expression est régulée par certains facteurs de croissance (PDGF, EGF, TGF $\beta$ ) et cytokines de l'inflammation (IL-1, TNF $\alpha$ ), mais pas par l'hypoxie.

Des molécules exogènes de la famille du VEGF ont également été découvertes chez des non-mammifères.

### II.2.1.2.4 Le VEGF-E

Le VEGF-E a été identifié en 1994 dans le génome d'un virus parapox (Orf, *open reading frame*) <sup>(118)</sup>. Ce virus peut infecter les moutons et les chèvres, et, occasionnellement, les humains, où il cause des lésions de la peau résultant d'une prolifération et d'une dilatation capillaires. Il s'agit en fait d'un groupe de protéines, comprenant le VEGF-E<sub>NZ-2</sub> <sup>(119)</sup>, le VEGF-E<sub>NZ-7</sub> <sup>(120)</sup>, le VEGF-E<sub>NZ-10</sub> <sup>(121)</sup>, le VEGF-E<sub>D1701</sub> <sup>(122)</sup>, et le VEGF-E<sub>VR634</sub> <sup>(121)</sup>. Ils se lient tous au VEGFR-2, mais pas au VEGFR-1, ni au VEGFR-3. En outre, le VEGF-E<sub>NZ-2</sub>, le VEGF-E<sub>NZ-10</sub> et le VEGF-E<sub>D1701</sub>, contrairement au VEGF-E<sub>NZ-7</sub> et au VEGF-E<sub>VR634</sub>, peuvent se lier à la NRP-1 (*Tableau 4*, page 21), par leur région C-terminale <sup>(123)</sup>.

### II.2.1.2.5 Le VEGF-F

Il a été isolé à partir du venin de serpents. Il s'agit d'une famille de protéines, comprenant notamment le svVEGF <sup>(124)</sup>, le TfsvVEGF <sup>(125)</sup>, le facteur hypotensif HF <sup>(126)</sup>, ICPP (*increasing capillary permeability protein*) <sup>(127)</sup> et la vamine <sup>(128)</sup>. Ils se lient avec des affinités différentes au VEGFR-2, mais pas au VEGFR-3 ou à la NRP-1.

## II.2.2 Les récepteurs au VEGF

Il existe plusieurs récepteurs de la famille du VEGF. Les principaux récepteurs, et les premiers identifiés, sont les récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK).

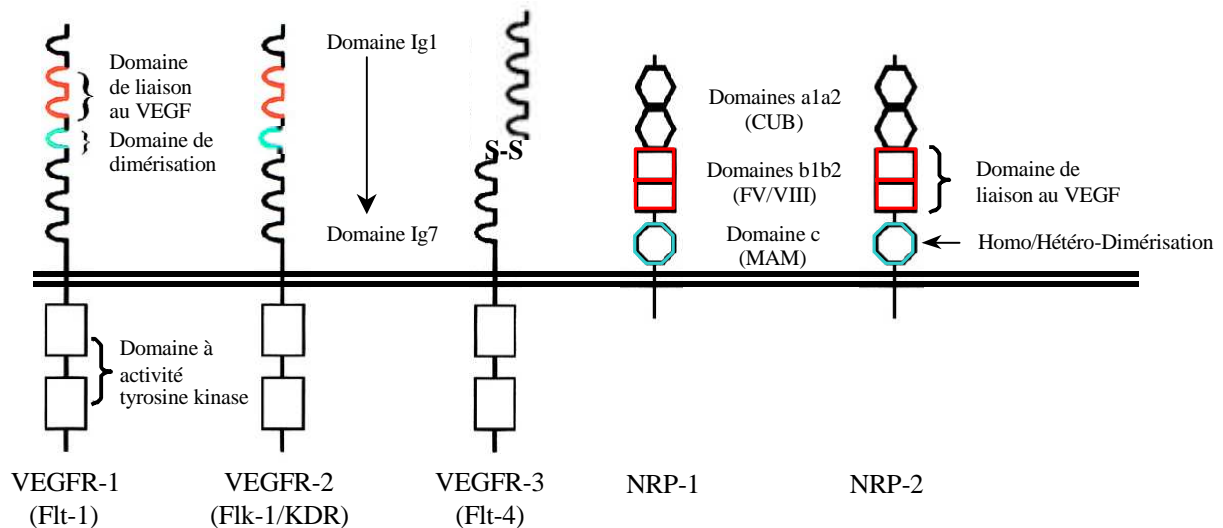


Figure 7. Caractéristiques structurales principales des récepteurs de la famille du VEGF : les 3 récepteurs à activité TK (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3), et les co-récepteurs neuropiline-1 et -2 (NRP-1 et NRP-2) (adapté d'après <sup>(54)</sup>).

### II.2.2.1 Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Il existe trois récepteurs de la famille du VEGF à activité TK, appartenant à la super-famille du récepteur au PDGF : **VEGFR-1** (*fms-like tyrosine kinase-1*, Flt-1) <sup>(129, 130)</sup>, **VEGFR-2** (*fetal liver kinase-1*, Flk-1 pour sa version murine ou *kinase insert domain-containing receptor*, KDR, pour son homologue humain) <sup>(131, 132)</sup>, et **VEGFR-3** (*fms-like tyrosine kinase-4*, Flt-4) <sup>(114)</sup>. Chez l'adulte, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont exprimés essentiellement au niveau des cellules endothéliales vasculaires, tandis que le VEGFR-3 est localisé principalement au niveau de l'endothélium lymphatique. Chaque sous-type de la famille du VEGF (VEGF-A, -B, -C, -D, -E, -F et PlGF) peut se lier à l'un ou plusieurs de ces récepteurs (Tableau 4, page 21), ce qui résulte en diverses fonctions biologiques.

#### II.2.2.1.1 Caractéristiques communes

Ces récepteurs à activité TK sont des protéines transmembranaires possédant une **région extracellulaire** impliquée dans la reconnaissance et la fixation du ligand, et un **domaine intracytoplasmique** à activité TK, reliés entre eux par une **région transmembranaire** unique, composée d'une séquence hydrophobe permettant au récepteur d'être ancré dans la membrane (Figure 7).

Suite à la **fixation du ligand** (dimère) au niveau d'un ou plusieurs des sept domaines immunoglobuline (Ig)-like constituant le domaine extracellulaire de deux récepteurs monomères <sup>(133)</sup>, le récepteur est **dimérisé**. La protéine kinase de chaque monomère du récepteur **phosphoryle** des résidus tyrosine (Y) de l'autre monomère du récepteur (auto/trans-phosphorylation), au niveau de la portion intracytoplasmique, ce qui résulte en une activation du récepteur et en une cascade de transduction du signal.

Le domaine intracellulaire à activité TK est la partie où l'on retrouve le plus d'homologies entre VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Il contient une région juxta-membranaire, pouvant contenir des sites de phosphorylation sur Y, et ainsi servir de point d'ancrage à des molécules impliquées dans la signalisation. Le domaine catalytique possède l'activité TK, et est constituée de deux lobes, interrompus par une séquence spécifique, dénommée l'insert kinase (*Figure 7*). Enfin, l'extrémité C-terminale contient des résidus tyrosine phosphorylables, et est impliquée également dans le recrutement de protéines de la signalisation.

Une fois phosphorylé, le récepteur ne peut plus être déphosphorylé. Pour stopper son action, la cellule va **internaliser** le récepteur par endocytose. La protéine va ensuite être dégradée dans un lysosome ou être recyclée à la surface de la cellule.

Parmi les récepteurs à activité TK, le VEGF (VEGF-A) se fixe uniquement sur le VEGFR-1 et le VEGFR-2. Ces deux récepteurs présentent environ 50% d'homologie au niveau de leur séquence d'acides aminés <sup>(98)</sup>. Des études de délétion sur les différents domaines extracellulaires des récepteurs ont montré que la **reconnaissance du ligand** se faisait au niveau des **Ig 2 et 3** de ces récepteurs, et que la **dimérisation impliquait l'Ig 4** (*Figure 7*) <sup>(133-137)</sup>. Néanmoins, malgré ces similitudes, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 diffèrent en terme d'affinité pour les différents membres de la famille du VEGF et de transduction du signal.

### ***II.2.2.1.2 Le récepteur au VEGF de type 1 (VEGFR-1, Flt-1)***

Le VEGFR-1 (180 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, VEGF-B, PlGF et TfsvVEGF (*Tableau 4*, page 21). Son gène est situé sur le chromosome 13 chez l'homme. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi par des cellules non endothéliales, comme les macrophages et les monocytes <sup>(138-140)</sup>, et les cellules souches

hématopoïétiques<sup>(141)</sup>. Le VEGF-B et le PlGF se fixent essentiellement au niveau de son deuxième domaine Ig<sup>(52, 107)</sup>.

Le VEGF-A se lie au VEGFR-1 avec une affinité au moins 10 fois supérieure à celle pour le VEGFR-2 (*Tableau 4*, page 21), mais l'activité kinasique qui en résulte est inférieure<sup>(52)</sup>. De plus, des souris transgéniques dans lesquelles seul le domaine kinase de ce récepteur a été supprimé se développent normalement<sup>(142)</sup>. Cela conduit à penser à un autre rôle du VEGFR-1 que celui lié à l'activation de sa portion kinase, qui pourrait provenir de son domaine extracellulaire. Il a ainsi été suggéré que le VEGFR-1 servait à **capturer le VEGF en excès** afin de limiter la signalisation *via* le VEGFR-2. En accord avec cette théorie, des embryons de souris *Flt-1*<sup>-/-</sup> meurent entre E8,5 et E9,5, du fait, non d'une absence de cellules endothéliales matures, mais d'une désorganisation des vaisseaux sanguins<sup>(143)</sup>, résultant d'une prolifération excessive des hémangioblastes, les progéniteurs endothéliaux<sup>(144)</sup>.

Le VEGFR-1 est également impliqué dans la **migration** des cellules endothéliales. En effet, des anticorps anti-VEGFR-1 bloquent la migration, mais non la prolifération, de cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), en réponse à une stimulation du VEGF-A<sup>(145)</sup>. Le VEGFR-1 est aussi impliqué dans la migration des monocytes et macrophages<sup>(140)</sup>, et le recrutement des cellules souches hématopoïétiques<sup>(141)</sup>. Le VEGFR-1 peut former des hétérodimères avec le VEGFR-2, et ces hétérodimères sont à l'origine de la transduction de signaux différents de ceux induits par les homodimères de VEGFR-1 ou de VEGFR-2<sup>(146, 147)</sup>.

Une **forme soluble du VEGFR-1** contenant seulement les six premiers domaines Ig a été clonée à partir d'une banque d'ADN complémentaires issue de cellules HUVEC<sup>(52)</sup>. Le VEGFR-1 soluble inhibe l'activité du VEGF-A en le séquestrant<sup>(148)</sup>.

### ***II.2.2.1.3 Le récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1)***

Le VEGFR-2 (200-230 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-A, le VEGF-E et le VEGF-F, ainsi que pour les formes clivées de VEGF-C et VEGF-D (*Tableau 4*, page 21). Son gène est situé sur le chromosome 4 chez l'homme, et 5 chez la souris. Le VEGFR-2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ainsi que d'autres types cellulaires, tels les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques<sup>(149)</sup> et les CML<sup>(150, 151)</sup>. Il est considéré comme le principal médiateur des effets mitogéniques et

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

chimiotactiques du VEGF-A. Il est indispensable au cours du développement embryonnaire, car des embryons de souris Flk-1<sup>-/-</sup> meurent entre E8,5 et E9,5, du fait d'une absence de cellules endothéliales matures <sup>(152)</sup>. Des études récentes ont démontré son rôle dans la lymphangiogenèse <sup>(153, 154)</sup>. Une forme soluble endogène du VEGFR-2 a également été détectée dans le plasma humain et murin <sup>(155)</sup>.

Suite à la liaison du VEGF au niveau du domaine extracellulaire de VEGFR-2, le récepteur est dimérisé, et des résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés. Les signaux intracellulaires induits sont divers (*Figure 8*):

- **Prolifération** cellulaire, par l'activation des ERKs (*extracellular-signal-regulated proteins kinases*). La phospholipase C (PLC)- $\gamma$  se lie à Y-1175 (*Figure 8*) *via* son domaine SH2 (*Src homology-2*). Suite à la phosphorylation de Y-1175, PLC- $\gamma$  est activée, ce qui conduit à l'hydrolyse du phospholipide membranaire PIP<sub>2</sub> (phosphatidylinositol(4,5)-biphosphate). Cela aboutit à la génération de messagers secondaires, DAG (1,2-diacylglycerol) et IP<sub>3</sub> (inositol(1,4,5)-triphosphate). DAG est un activateur physiologique de PKC (protéine kinase C), impliquée dans l'activation de ERK, *via* Raf et MEK 1/2 (ou MAPK (*mitogen activated protein kinase*) /ERK1/2). Cette voie joue également un rôle essentiel dans l'activation de cPLA<sub>2</sub> (*cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>*), qui conduit à la génération de prostacycline (PGI<sub>2</sub>), produit de la cyclooxygénase (COX) et d'oxyde nitrique (NO) ;

- **Survie** cellulaire. Les cellules endothéliales vasculaires des vaisseaux immatures requièrent des signaux de survie, en l'absence desquels une apoptose est induite <sup>(156-158)</sup>. Cette voie fait intervenir en partie l'activation par PI3K de la protéine anti-apoptotique Akt/PKB (protéine kinase B), mais le mécanisme d'activation de PI3K reste inconnu <sup>(159)</sup>. Akt phosphoryle et inhibe les protéines pro-apoptotiques BAD et caspase-9. Ces signaux de survie font également intervenir VE (*vascular endothelial*)-cadhérine, présente au niveau des jonctions entre cellules endothéliales <sup>(160)</sup> et les intégrines ;

- Induction de la **perméabilité** vasculaire <sup>(45, 161)</sup>, avec une activité du VEGF environ 50 000 fois supérieure à celle de l'histamine <sup>(162)</sup>. Akt induit l'activation par phosphorylation de eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*). Par ailleurs, IP<sub>3</sub> se lie à un récepteur spécifique présent sur le réticulum endoplasmique (ER), ce qui induit la libération

## Partie II : Synthèse bibliographique

du calcium  $Ca^{2+}$ , et va permettre la production de NO, inducteur de la perméabilité vasculaire. L'augmentation de la perméabilité provoque l'extravasation de protéines plasmatiques, comme la fibrine. Il se constitue alors un gel de fibrine extracellulaire, qui forme un substrat pour la croissance endothéliale vasculaire <sup>(163)</sup> ;

- Et, **migration** cellulaire. La production de NO jouerait un rôle dans la migration cellulaire. Une voie faisant intervenir p38/MAPK aurait également des effets sur la migration cellulaire, mais le mécanisme d'activation de cette protéine est inconnu. Par ailleurs, la phosphorylation de FAK (*focal adhesion kinase*) constitue un lien entre les signaux induits par le VEGF et les intégrines <sup>(164)</sup>. Il a été montré que l'activation du VEGFR-2 par le VEGF activait plusieurs intégrines, ce qui augmente l'adhésion et la migration cellulaires <sup>(165)</sup>.

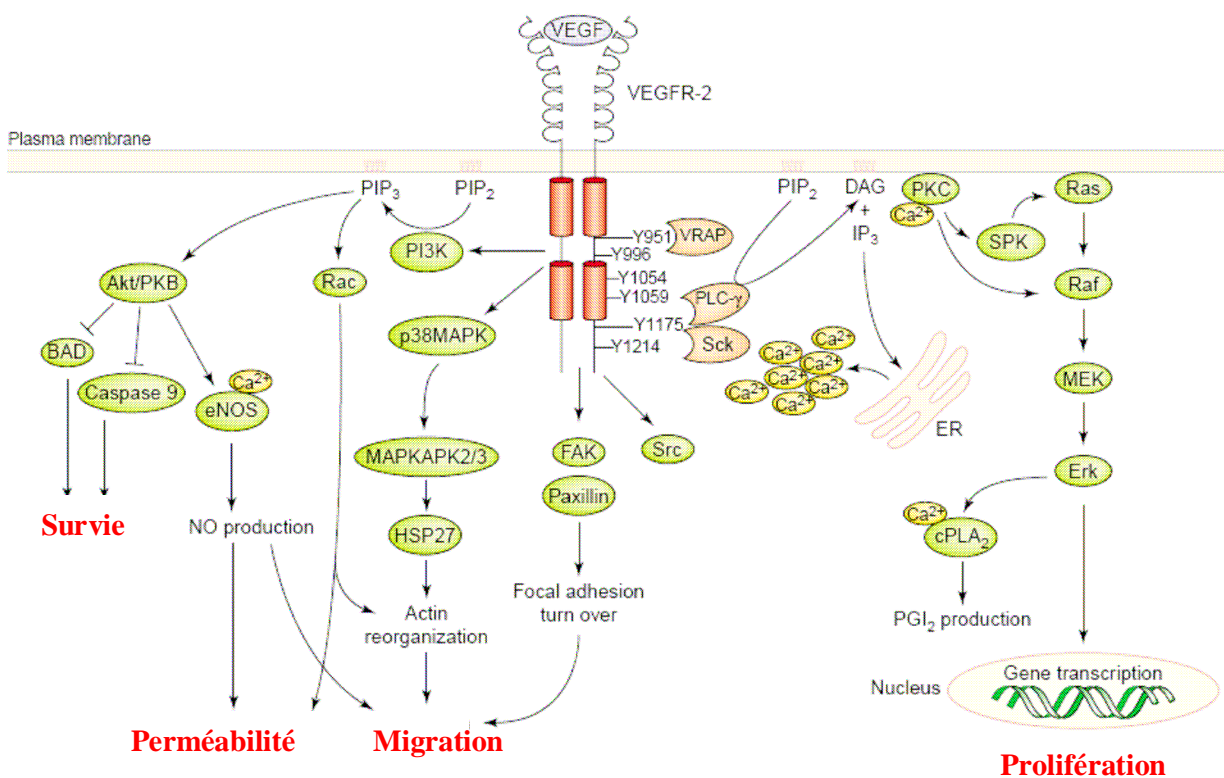


Figure 8. Signalisation intracellulaire médiée par le VEGFR-2 <sup>(166)</sup>. Suite à la liaison du ligand au niveau de son domaine extracellulaire, le récepteur est dimérisé, et des résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés, les sites majeurs étant Y1175 et Y1214. Les différentes voies de transduction du signal conduisent à divers effets : perméabilité vasculaire, survie, migration et prolifération des cellules endothéliales.

Un troisième membre de cette famille, qui n'est pas un récepteur du VEGF (VEGF-A), est cependant reconnu par le VEGF-C et le VEGF-D.



### II.2.2.1.4 Le récepteur au VEGF de type 3 (VEGFR-3, Flt-4)

Le VEGFR-3 (195 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D ; c'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. Son gène est situé sur le chromosome 5 chez l'homme. Contrairement au VEGFR-1 et au VEGFR-2, le VEGFR-3 est clivé par protéolyse au niveau du cinquième domaine Ig et les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure <sup>(115)</sup>.

Chez l'embryon, le VEGFR-3 est initialement présent sur tous les vaisseaux (sanguins et lymphatiques), mais cette expression va ensuite se limiter aux vaisseaux lymphatiques <sup>(167)</sup>. L'inactivation du gène codant pour le VEGFR-3 est létale (E8,5) par malformation du réseau vasculaire primaire et insuffisance cardiaque avant que le système lymphatique ne soit développé, ce qui suggère un rôle important du VEGFR-3 dans le développement cardiovasculaire chez l'embryon <sup>(168)</sup>. Chez l'adulte, le VEGFR-3 est principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGF-C peut induire la formation d'hétérodimères VEGFR-2/VEGFR-3 sur les cellules endothéliales lymphatiques <sup>(169)</sup>.

D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont plus récemment été identifiés. Il s'agit des neuropilines (NRP), qui sont considérées comme jouant un rôle de co-récepteurs des isoformes du VEGF liant l'héparine <sup>(93, 170)</sup>.

### II.2.2.2 Les neuropilines

La neuropiline a été identifiée pour la première fois en 1991 à la surface des neurones d'embryons *Xenopus*, mais était connue à l'époque sous le nom d'antigène A5 <sup>(171)</sup>. En 1997, deux équipes rapportèrent qu'il s'agissait d'un récepteur de SEMA3A, une des sémaphorines (SEMA) de classe 3 <sup>(172)</sup>. Un homologue de la neuropiline ayant plus tard été identifié et nommé neuropiline-2 (NRP-2), la neuropiline fut renommée neuropiline-1 (NRP-1). Si les NRPs ont, à l'origine, été identifiées pour leur rôle essentiel dans le guidage axonal au cours du développement du système nerveux chez l'embryon <sup>(173)</sup>, leur rôle a par la suite été démontré dans l'angiogenèse adulte, en agissant comme récepteurs du VEGF<sub>165</sub> <sup>(174, 175)</sup>. Il est intéressant de noter que d'autres familles de molécules (éphrine/Eph, nétrine/UNC5 et slit/Robo), originellement impliquées dans le développement du système nerveux, sont

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

désormais associées à la vasculogénèse et à l'angiogénèse, suggérant un parallèle entre les molécules de l'angiogénèse et celles impliquées dans le guidage axonal <sup>(176)</sup>.

### II.2.2.2.1 Structure des neuropilines

Les NRPs sont des récepteurs non à activité TK de 120 à 130 kDa <sup>(93, 177)</sup>, composées de 5 domaines : une portion extracellulaire de 860 acides aminés composée de 3 domaines (a1a2, b1b2 et c), un domaine transmembranaire de 23 acides aminés, et un court domaine cytoplasmique d'environ 40 acides aminés (*Figure 7*, page 24).

Le domaine a1a2 est un domaine CUB (*C1r/C1s, uEGF, bone morphogenetic protein*) comprenant 4 résidus cystéine formant 2 ponts disulfures. Le domaine b1b2 présente une homologie avec le domaine N-terminal du facteur de coagulation FV/VIII. Ce sont les domaines de fixation du ligand. Le troisième domaine extracellulaire (c ou MAM, pour *Meprin, A5/PTPμ, κ*) est essentiel pour l'homo- et l'hétéro-dimérisation du récepteur. Le domaine cytoplasmique est court et ne contient pas de motif kinase, ce qui suggère une absence de signalisation par le récepteur lui-même. Malgré une homologie de structure au niveau de ces différents domaines, la NRP-1 et la NRP-2 ne présentent qu'une homologie à 44% au niveau de leur séquence en acides aminés <sup>(178)</sup>.

Il existe plusieurs isoformes de la NRP-1 et de la NRP-2 <sup>(94, 172, 179-181)</sup>, dont certaines formes solubles à l'état monomère pourraient agir comme des antagonistes des activités cellulaires induites par la fixation du VEGF à ces récepteurs. En revanche, des dimères de la NRP-1 soluble favorisent les effets pro-angiogéniques induits par le VEGF<sub>165</sub> <sup>(182)</sup>.

La NRP-2 présente deux variants : NRP-2A et NRP-2B <sup>(183)</sup>. Le domaine intracellulaire de la NRP-2B diffère fortement de ceux, plus proches, de la NRP-1 et de la NRP-2A <sup>(172)</sup>. La NRP-2A est principalement exprimé dans le foie, le placenta, les poumons, l'intestin, le cœur et les reins, alors qu'on retrouve la NRP-2B dans le cœur et le muscle squelettique <sup>(172)</sup>.

### II.2.2.2.2 Ligands des neuropilines

Les NRPs agissent comme des récepteurs ou des co-récepteurs pour deux classes de ligands : les SEMA de classe 3 (SEMA3) et certains sous-types de la famille du VEGF.

Les SEMA, ou collapsines, sont impliquées dans le guidage axonal au cours du développement embryonnaire <sup>(172)</sup>, en induisant le collapsus des cônes de croissance des axones, un procédé qui permet l'organisation des neurones. Parmi les 8 classes existantes, seules les SEMA3 (SEMA3A, B, C, D, E et F) se lient aux NRPs. La NRP-1 lie toutes les SEMA3, mais la NRP-2 ne reconnaît pas SEMA3A. Parmi elles, il a été montré que SEMA3A, SEMA3B et SEMA3F présentaient des propriétés anti-tumorales, car elles entrent en compétition avec le VEGF<sub>165</sub> pour la liaison aux NRPs <sup>(184-188)</sup>, et pourraient ainsi contrer les effets pro-angiogéniques induits par la liaison du VEGF<sub>165</sub> aux NRPs.

En 1998, Soker *et al* démontrèrent que la NRP-1 reconnaissait également certaines isoformes du VEGF se liant à l'héparine <sup>(93)</sup>. Les molécules de la famille du VEGF reconnaissant la NRP-1 et/ou la NRP-2 sont indiquées dans le *tableau 4* (page 21). La NRP-1 et la NRP-2 reconnaissent le VEGF<sub>165</sub>, mais seule la NRP-2 reconnaît VEGF<sub>145</sub>. La NRP-2 se lie également au VEGF-C et au VEGF-D <sup>(189)</sup>. Les deux domaines a1a2 et b1b2 sont essentiels pour la liaison de SEMA3A, mais seul le domaine b1b2 est requis pour la liaison du VEGF<sub>165</sub> <sup>(190-192)</sup>.

### II.2.2.2.3 Expression des neuropilines

L'expression des NRPs a été détectée dans les ostéoblastes <sup>(193, 194)</sup>, les cellules neuroendocrines du tractus gastro-intestinal <sup>(195)</sup>, les cellules dendritiques <sup>(196, 197)</sup>, les lymphocytes T <sup>(196)</sup>, les fibroblastes, les adipocytes de la moelle osseuse <sup>(198, 199)</sup>, et les cellules épithéliales glomérulaires <sup>(200)</sup>.

Les NRPs sont également présentes dans les **vaisseaux** matures et en développement, à la fois sur les CML <sup>(201)</sup> et sur les cellules endothéliales <sup>(202)</sup>, mais également au niveau de l'endothélium vasculaire des tumeurs <sup>(201, 203-205)</sup>. L'expression de la NRP-2 au niveau endothélial semble être restreinte aux veines et aux vaisseaux lymphatiques <sup>(206)</sup>. L'expression de la NRP-1 est régulée dans les cellules endothéliales par le TNF $\alpha$ , les facteurs de transcription dHAND et Ets-1, et les dommages vasculaires <sup>(207)</sup>. L'expression de la NRP-1, mais pas de la NRP-2, sur les cellules endothéliales, est accrue en présence de VEGF, par un mécanisme faisant intervenir VEGFR-2 <sup>(208)</sup>.

La NRP-1 et la NRP-2 sont aussi exprimées au niveau de plusieurs types de **cellules tumorales**. Par exemple, dans les cancers du poumon non à petites cellules, l'expression de la NRP-1 et de la NRP-2 est supérieure à celle trouvée dans les tissus non néoplasiques <sup>(209)</sup>. L'hypoxie induit l'expression de la NRP-1 dans des cellules de neuroblastome, mais diminue son expression dans des cellules d'astrocytome <sup>(210, 211)</sup>. L'activation des récepteurs à l'EGF a également été démontrée comme inductrice de l'expression de la NRP-1 dans plusieurs systèmes tumoraux, probablement par les voies PI3K/Akt et p38 MAPK/ERK1/2 <sup>(210, 212, 213)</sup>.

### II.2.2.2.4 Effets médiés par les neuropilines

- **Rôle des neuropilines**

Les NRPs interviennent lors du **développement embryonnaire** (système cardio-vasculaire et système nerveux), et chez l'adulte, notamment en conditions pathologiques (rôle dans **l'angiogenèse tumorale et le processus métastatique**).

Chez l'embryon, une absence d'expression de la NRP-1 (souris NRP-1<sup>-/-</sup>) conduit à une mort *in utero* à E14, du fait de défauts importants dans le système cardio-vasculaire et d'un développement neural désorganisé <sup>(214)</sup>. Au contraire, une sur-expression de la NRP-1 résulte en la formation d'un excès de capillaires et en l'apparition d'hémorragies <sup>(207)</sup>. La NRP-2 semble surtout jouer un rôle dans la formation des petits vaisseaux et des capillaires lymphatiques, mais pas dans le développement des artères, des veines et des vaisseaux lymphatiques plus larges <sup>(215)</sup>.

Par ailleurs, la NRP-1 est impliquée dans la croissance et l'apparition de métastases dans le cancer du colon <sup>(213)</sup>, et dans l'angiogenèse et la croissance tumorales dans le cancer de la prostate <sup>(175)</sup>. Dans des tumeurs humaines, l'expression de la NRP-1 est corrélée avec la croissance tumorale et le pouvoir invasif du cancer de la prostate <sup>(216)</sup>, colorectal <sup>(213, 217)</sup>, du poumon <sup>(218)</sup>, du sein <sup>(201)</sup> et des astrocytomes <sup>(203, 210)</sup>. Dans le cancer de la vessie, l'expression de la NRP-2 est corrélée avec l'avancement du cancer <sup>(219)</sup>. A l'opposé, dans certaines études, la corrélation semble inverse. Ainsi, dans des cellules de cancer du pancréas, la sur-expression de la NRP-1 conduit à une diminution de la croissance tumorale, et le *knock down* de l'expression de la NRP-1 endogène par ARN interférence à une augmentation de cette croissance <sup>(220)</sup>. Dans des tumeurs carcinoïdes gastro-intestinales également, la perte de

l'expression de la NRP-2 est corrélée avec la progression tumorale <sup>(195)</sup>. Ces résultats parfois opposés soulignent la complexité du système des NRPs.

Dans certains modèles animaux, il a été démontré que l'expression de la NRP-1 au niveau des cellules cancéreuses favorisait l'angiogenèse tumorale <sup>(175, 213)</sup>. Suite à sa liaison à la NRP-1, le VEGF stimule la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, et l'utilisation d'un anticorps anti-NRP-1 supprime les effets mitogéniques induits par le VEGF<sub>165</sub> sur des cellules endothéliales bovines de la rétine <sup>(208)</sup>.

La signalisation médiée par les NRPs semble nécessiter une **interaction avec un autre récepteur** (plexine, au niveau des neurones, ou VEGFR, au niveau des cellules endothéliales), mais certaines études laissent penser qu'elle pourrait également exister **en l'absence d'une telle association**.

- **Les neuropilines en tant que co-récepteurs**

Il est généralement admis que, du fait de leur court domaine intracellulaire ne possédant pas d'activité TK, les NRPs ne peuvent pas seules transmettre de signaux intracellulaires, et que des complexes avec des co-récepteurs sont requis. Les plexines forment des complexes avec les NRPs, même en l'absence du ligand <sup>(178)</sup>. Les SEMA3 sont reconnues par la NRP, au niveau des domaines a1a2 et b1b2 de celle-ci, mais ne peuvent pas se lier directement à la plexine-A. Il se formerait alors un complexe ternaire entre la NRP, la plexine et la SEMA3 <sup>(221)</sup>, qui induirait une signalisation *via* la plexine-A.

De façon similaire, la signalisation médiée par le VEGF<sub>165</sub> *via* la NRP-1 se ferait par la formation de complexes avec le VEGFR-2 <sup>(93, 170)</sup>. Contrairement à l'isoforme VEGF<sub>121</sub>, l'isoforme VEGF<sub>165</sub> se lie à la NRP-1, du fait de la présence d'un domaine encodé par l'exon 7, (*Figure 6A*, page 20) <sup>(177, 202)</sup>. Le VEGF<sub>165</sub> se lie par ailleurs au VEGFR-2, *via* une région codée par l'exon 4, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire entre le VEGF<sub>165</sub>, NRP-1 et VEGFR-2 (*Figure 9*) <sup>(222, 223)</sup>. La présence de la NRP-1 augmente la liaison du VEGF<sub>165</sub> à VEGFR-2 <sup>(223)</sup>, et potentialise les effets mitogéniques et chimiotactiques médiés par le VEGFR-2 <sup>(93, 224, 225)</sup>. Cela pourrait expliquer la moindre activité pro-angiogénique, comparé au VEGF<sub>165</sub>, du VEGF<sub>121</sub>, puisque que ce dernier ne se lie pas à la NRP-1 <sup>(224)</sup>.

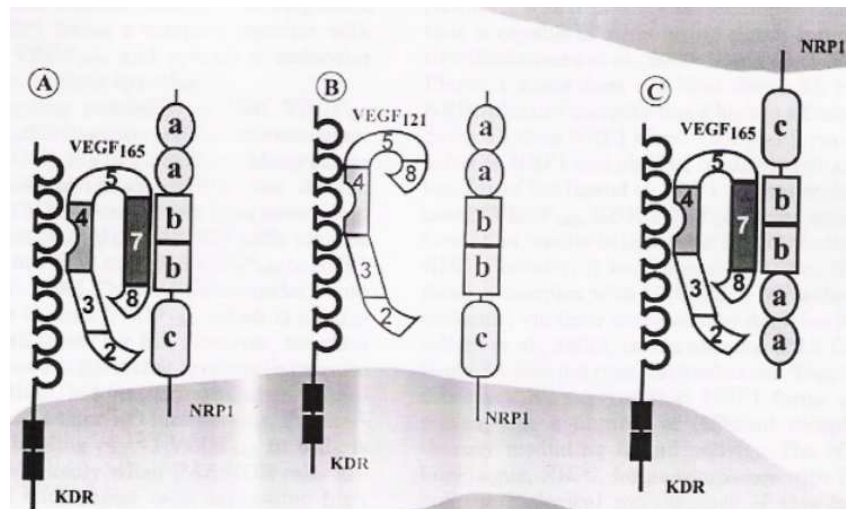


Figure 9. Interaction de la NRP-1 avec VEGFR-2/KDR. A. L'isoforme VEGF<sub>165</sub> se lie à la NRP-1, du fait de la présence d'un domaine encodé par l'exon 7 et au VEGFR-2/KDR, via une région codée par l'exon 4, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire entre le VEGF<sub>165</sub>, NRP-1 et VEGFR-2. B. L'isoforme VEGF<sub>121</sub>, ne possédant pas l'exon 7, ne peut se lier à NRP-1. C. Des complexes juxtacrines peuvent également se créer entre NRP-1 et VEGFR-2/KDR situés sur deux cellules différentes, par exemple des cellules tumorales et des cellules endothéliales.

D'autres complexes ont également été décrits : NRP-1 avec le VEGFR-1<sup>(94, 226)</sup> et NRP-2 avec le VEGFR-1<sup>(94)</sup>, le VEGFR-2 et le VEGFR-3<sup>(189, 227)</sup>, dont le rôle respectif reste à préciser.

- **Possibilité d'une signalisation propre**

Néanmoins, le dogme selon lequel les NRPs ne pourraient pas seules transmettre de signaux intracellulaires tend à être remis en cause. En effet, l'expression des NRPs a été observée dans plusieurs types de cancer, notamment du pancréas<sup>(228)</sup>, du sein<sup>(229, 230)</sup> et le neuroblastome<sup>(231)</sup>, en l'absence de VEGFR-1 et VEGFR-2. S'il a été montré que des complexes intercellulaires pouvaient se créer, d'une manière juxtacrine, entre la NRP-1 situé sur des cellules de carcinomes du sein et le récepteur KDR situé sur des cellules endothéliales, par le biais du VEGF<sub>165</sub><sup>(223)</sup> (Figure 9C), il semble que ce ne soit pas le seul rôle joué par les NRPs en l'absence de co-récepteur.

Plusieurs études suggèrent que la signalisation médiée par le VEGF via les NRPs peut se faire en l'absence de VEGFR-1 ou de VEGFR-2<sup>(93, 177, 232, 233)</sup>. Ainsi, le VEGF<sub>165</sub> inhibe l'apoptose dans la lignée de cancer du sein humain MDA-MB-231, qui exprime NRP-1 mais pas VEGFR-2. Le VEGF<sub>121</sub>, qui ne reconnaît pas la NRP-1, n'induit pas ce type d'effet, ce

qui suggère que le VEGF<sub>165</sub> apporte un signal de survie transduit par la NRP-1<sup>(229)</sup>. Wang *et al* ont, quant à eux, utilisé une protéine de fusion comportant la portion extracellulaire du récepteur à l'EGF, et les portions transmembranaire et intracellulaire de la NRP-1, et transfecté ce récepteur dans des HUVEC, qui ne possèdent pas naturellement de récepteur à l'EGF<sup>(232)</sup>. L'ajout d'EGF à ces cellules a induit une signalisation intracellulaire, démontrant que la signalisation *via* les NRPs peut se faire indépendamment de l'association avec les VEGFRs.

La NRP-1 possède un domaine PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) dans sa portion C-terminale intracytoplasmique qui est associé à la protéine NIP (*NRP-1-interacting protein*). Cette protéine de 40 kDa présente également un domaine PDZ, qui lui permet de s'associer au domaine PDZ présent sur la NRP-1, au niveau de ses 3 derniers acides aminés (H-Ser-Glu-Ala-OH ou SEA)<sup>(234)</sup>. Ce domaine PDZ se retrouve également dans les protéines GIPC (*RGS-GAIP-interacting protein C terminus*) et SEMCAP-1 (*M-SemaF cytoplasmic domain-associated protein-1*)<sup>(172)</sup>. NIP pourrait constituer un lien entre la NRP-1 et des molécules intracellulaires de signalisation. Une étude très récente suggère que cette protéine joue un rôle dans la migration des cellules endothéliales médiée par la NRP-1<sup>(235)</sup>, mais des études plus poussées doivent être réalisées afin d'élucider ces mécanismes.

### II.3 THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE ET THERAPIE ANTI-NEOVASCULAIRE

Du fait de la forte dépendance des tumeurs vis-à-vis de l'angiogenèse, les vaisseaux tumoraux sont rapidement apparus comme une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement des cancers. Deux démarches sont développées : l'une vise à inhiber la formation de nouveaux vaisseaux (**thérapie anti-angiogénique**) ; l'autre, plus récente, consiste à développer des thérapies qui vont spécifiquement détruire la vascularisation nouvellement formée des tumeurs (**thérapie anti-néovasculaire**).

#### II.3.1 Thérapie anti-angiogénique

Dans les années 70, Judah Folkman, un chirurgien du *Children's Hospital* de Boston, observa que toute tumeur de taille supérieure à 1-2 mm<sup>3</sup> développait son propre réseau vasculaire. Il suggéra alors que la croissance des tumeurs solides était dépendante de l'angiogenèse et énonça pour la première fois le concept des molécules anti-angiogéniques. En effet, puisque la croissance tumorale est dépendante de la formation d'un réseau vasculaire, il postula que le traitement avec des molécules inhibant la formation de ces néovaisseaux tumoraux pourrait inhiber la croissance tumorale <sup>(236)</sup>. C'est à partir des années 90 que les données expérimentales ont véritablement corroboré cette hypothèse et engendré un véritable engouement. Qu'une hyper-angiogenèse accompagne le développement d'une tumeur est aujourd'hui un fait établi pour de nombreuses tumeurs, y compris hématologiques, comme les leucémies <sup>(237)</sup> ou le myélome multiple <sup>(238)</sup>.

##### II.3.1.1 Les avantages de la thérapie anti-angiogénique

Par rapport aux thérapeutiques classiques visant surtout les cellules tumorales, les thérapies anti-angiogéniques offrent plusieurs avantages potentiels <sup>(35, 43)</sup> :

- Puisque les cellules endothéliales bordent les vaisseaux sanguins, elles devraient être **facilement accessibles** par administration systémique. Au contraire, avec les thérapies anticancéreuses traditionnelles, il est difficile d'accéder au tissu tumoral, du fait de pressions interstitielles élevées ;



## Partie II : Synthèse bibliographique

---

- Plusieurs cellules cancéreuses sont alimentées par un seul capillaire, et les cellules endothéliales associées aux tumeurs peuvent sécréter des facteurs de croissance autocrines et paracrines. En conséquence, l'inhibition d'un petit nombre de vaisseaux tumoraux pourrait **affecter la croissance de nombreuses cellules tumorales** ;

- Dans un organisme adulte, les cellules endothéliales sont, pour leur immense majorité, dans un état quiescent (0,1% des cellules endothéliales environ sont dans un état prolifératif), contrairement aux cellules endothéliales associées aux tumeurs, présentant un phénotype angiogénique. On peut donc attendre **peu d'effets secondaires** avec ce type d'approche stratégique ;

- Contrairement à l'instabilité génétique des cellules tumorales, propice à l'acquisition d'une résistance aux médicaments cytotoxiques, les cellules endothéliales sont génétiquement plus stables. L'acquisition d'une **résistance**, par mutation, est donc un phénomène qui, statistiquement, a **moins de chance** d'apparaître pour l'endothélium <sup>(239)</sup> ;

- Et, toutes les tumeurs de taille supérieures à 1-2 mm<sup>3</sup> sont vascularisées. De plus, contrairement aux cellules tumorales, qui expriment des facteurs de croissance et présentent des marqueurs moléculaires différents selon le type tumoral, les cellules endothéliales associées aux tumeurs sont relativement semblables d'une tumeur à l'autre. Une seule molécule pourrait donc être **utilisée pour tous les types tumoraux**.

L'angiogenèse résulte d'un déséquilibre de la balance entre facteurs anti-angiogéniques et facteurs pro-angiogéniques, en faveur de ces derniers. Le rétablissement de cette balance peut donc se faire, soit en augmentant la quantité de facteurs anti-angiogéniques, soit en diminuant la quantité ou en inhibant les effets de facteurs pro-angiogéniques, et ce, en agissant sur une ou plusieurs étapes de l'angiogenèse.

### II.3.1.2 Exemples de thérapies anti-angiogéniques

Puisque l'angiogenèse est initiée suite à la sécrétion de facteurs de croissance, tels que le VEGF, et à la sur-expression de ses récepteurs sur les cellules endothéliales des vaisseaux avoisinant la tumeur, une première stratégie consiste simplement à **diminuer l'expression de**

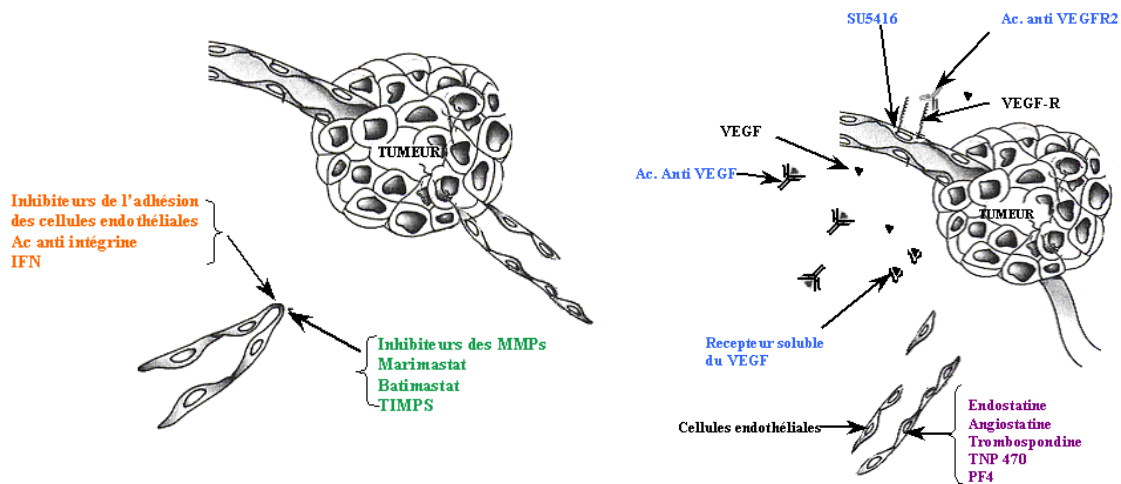
**ces facteurs de croissance et/ou de ces récepteurs.** Ainsi, puisque l'EGF facilite la sécrétion de VEGF par les cellules stromales, de multiples inhibiteurs de son récepteur EGFR sont actuellement en développement clinique. Il s'agit de petites molécules inhibitrices de TK, agissant en amont de la cascade induite par l'activation de l'EGFR, telles que le gefitinib (ZD-1839/Iressa<sup>®</sup>, AstraZeneca) et l'erlotinib (OSI-774/Tarceva<sup>®</sup>, Roche), ou d'anticorps monoclonaux (*e.g.* IMC-C225/cetuximab/Erbitux<sup>®</sup>, Merck-Lipha et ABX-EGF/panitumumab, Abgenix/Amgen) qui antagonisent la fixation de l'EGF à son récepteur <sup>(240)</sup>. Toujours dans l'idée de diminuer l'expression de VEGF, des oligonucléotides antisens neutralisant l'ARNm du VEGF ont été développés avec un potentiel anti-angiogénique <sup>(241, 242)</sup>. Un ribozyme synthétique (*ribonucleic acid enzyme*, molécule d'ARN qui catalyse son propre clivage) anti-VEGFR-1 (RPI 4610/Angiozyme<sup>®</sup>, Ribozyme Pharmaceuticals) a été développé dans le but de bloquer la synthèse de ce récepteur et est actuellement en essais cliniques de phase II pour le cancer du sein et le cancer colorectal <sup>(243)</sup>.

Il est également possible d'interférer avec le processus d'angiogenèse en **inhibant la dégradation de la MEC**, afin de bloquer les étapes d'invasion et de migration des cellules endothéliales. Cette stratégie repose essentiellement sur l'inhibition des MMPs, avec de petits inhibiteurs synthétiques (MMPIs), ciblant l'ion  $Zn^{2+}$  du site catalytique des MMPs. Les essais cliniques avec le premier des MMPIs en développement, le Batimastat (BB-94), ont été suspendus en raison de la faible biodisponibilité de celui-ci par voie orale. Cela a conduit à l'utilisation d'un composé voisin, le Marimastat (BB-2516), actuellement en essais de phase III dans le cancer du sein et le mélanome <sup>(244, 245)</sup>, et du Prinomastat (AG3340). De nouveaux MMPIs, plus spécifiques de certaines MMPs, ont par la suite été développés, *e.g.* Neovastat (AE-941), Metastat (CMT-3, COL-3, Collagenex), Tanomastat (BAY 12-9566), BMS-275291 et ONO-4817, actuellement en essais cliniques à divers avancements <sup>(246, 247)</sup>.

**La migration des cellules endothéliales peut être inhibée** en interférant avec l'adhésion des cellules endothéliales aux composants de la MEC (*Figure 10*). L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  représente une cible intéressante ; elle se lie spécifiquement à la séquence H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD) de la vitronectine. L'anticorps monoclonal anti- $\alpha_v\beta_3$  LM609 inhibe l'angiogenèse induite par le FGFb et induit l'apoptose des cellules endothéliales <sup>(248)</sup>. MEDI-522/Abegrin<sup>®</sup> (anciennement Vitaxin<sup>®</sup>, MedImmune) est une version humanisée de cet anticorps, en phase II d'essais cliniques <sup>(249)</sup>. Le cilengitide (EMD 121974), en essais cliniques de phase I, est un

## Partie II : Synthèse bibliographique

pentapeptide cyclique contenant le motif RGD, qui agit comme est un inhibiteur sélectif des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  <sup>(250)</sup>.



**Figure 10. Principaux agents inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales (gauche) et de leur prolifération (droite) <sup>(42)</sup>.** Les inhibiteurs de la dégradation de la MEC sont signalés en vert. En orange sont indiqués les agents prévenant l'adhésion des cellules endothéliales à la MEC provisoire ; ces agents ciblent des protéines exprimées par les cellules endothéliales. Les inhibiteurs des facteurs pro-angiogéniques sont signalés en bleu. Certains préviennent la liaison du VEGF à son récepteur (anticorps anti-VEGF ou anti-VEGF-R2, récepteur soluble du VEGF), d'autres comme le SU5416 inhibent la voie de signalisation activée par le VEGF. Les agents inhibant directement la prolifération des cellules endothéliales sont en violet. Ac= anticorps; IFN= interféron.

D'autres agents **interfèrent avec la liaison du VEGF avec son(s) récepteur(s)**, en se fixant, soit sur le facteur de croissance circulant, soit sur son(s) récepteur(s). Le ranibizumab ou Lucentis® (Genentech/Novartis), un fragment d'anticorps monoclonal qui reconnaît toutes les isoformes du VEGF, a été conçu pour le traitement de la DMLA <sup>(251)</sup>. Le bevacizumab ou Avastin® (Genentech), qui en est la version humanisée (affinité pour le VEGF :  $K_d \sim 0,5$  nM), induit une diminution de la perfusion tumorale, de la densité des microvaisseaux, de la pression interstitielle et du nombre de progéniteurs circulants des cellules endothéliales chez des patients avec un cancer rectal <sup>(252)</sup>. L'Avastin® est la première molécule à avoir reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis (par la *Food and Drug Administration*, FDA), en 2004. Elle est actuellement indiquée pour le traitement de première ligne du cancer métastatique du colon ou du rectum en association avec une chimiothérapie comprenant du 5-fluorouracile (5-FU). Le pegabtanib sodium ou Macugen® (Eyeteck Pharmaceuticals) est un aptamère d'ARN pegylé dirigé contre le VEGF<sub>165</sub>, qui a montré son efficacité en essais cliniques de phase III pour le traitement de la DMLA et est maintenant commercialisé <sup>(251)</sup>.

## Partie II : Synthèse bibliographique

Une autre stratégie consiste à utiliser des protéines contenant les domaines extracellulaires des récepteurs (récepteurs solubles), qui vont capturer le VEGF circulant, afin d'en diminuer la biodisponibilité, comme le VEGF-Trap/AVE0005 (Regeneron Pharmaceuticals). Celui-ci est constitué de portions des domaines extracellulaires du VEGFR-1 et du VEGFR-2, fusionnées avec le fragment Fc des IgG1 humaines. L'affinité du VEGF-Trap pour le VEGF est 100 fois supérieure ( $K_d \sim 1$  pM) à celle obtenue avec des anticorps monoclonaux. Il supprime la croissance tumorale et la vascularisation *in vivo*, conduisant à des tumeurs presque complètement avasculaires et à une diminution des métastases <sup>(253, 254)</sup>. Le VEGF-Trap est actuellement en phase I d'essais cliniques <sup>(255)</sup>.

L'IMC-1C11 (ImClone Systems), en phase I pour le cancer colorectal métastatique <sup>(256)</sup>, est un anticorps chimérique de type IgG1 dirigé contre le VEGFR-2, qui bloque l'interaction du VEGF avec ce récepteur et inhibe la prolifération des cellules endothéliales.

D'autres molécules agissent en aval de la transduction du stimulus angiogénique. Il s'agit de petits **inhibiteurs synthétiques de l'activité TK de récepteurs**, notamment au VEGF (*Tableau 5*).

**Tableau 5. Principales molécules inhibitrices de l'activité TK des récepteurs au VEGF** <sup>(257, 258)</sup>.

Nom	Société	Cible	Développement
SU5416 (semaxanib)	Sugen	VEGFR-2	Stoppé
SU6668	Pfizer (Sugen)	VEGFR-2, FGFR-1 et PDGFR	Phase II
SU11248 (Sutent)	Pfizer (Sugen)	VEGFR-1, VEGFR-2, PDGFR, c-Kit, Flt-3, c-Fms	Phase II/III
CP-547,632	Pfizer	VEGFR-2 et FGFR	Phase I/II
PTK787/ZK 222584	Novartis et Schering	VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, PDGFR, c-Kit, c-Fms	Phase III (cancer colorectal métastatique)
AZD2171	AstraZeneca	VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3	Phase II (cancer bronchique)
ZD6474	AstraZeneca	VEGFR-2 et EGFR	Phase II
Nexavar® (sorafenib), anciennement BAY 43-9006	Bayer et Onyx Pharmaceuticals	VEGFR, PDGFR, Raf, c-kit et Flt-3	AMM en 2005 (cancer du rein métastatique)

Cependant, l'enthousiasme initialement généré par les résultats prometteurs des essais précliniques avec les molécules anti-angiogéniques a été modéré suite à de premiers résultats cliniques décevants <sup>(257, 259)</sup>. Ceux-ci résultent en fait de problèmes méthodologiques liés à la conception d'**essais cliniques** adaptés aux molécules anti-angiogéniques <sup>(260)</sup>.

De plus, la survenue d'**effets secondaires** n'est pas à écarter <sup>(261, 262)</sup>, car le degré d'angiogenèse dans certaines conditions physiologiques est supérieur à celui trouvé dans certaines tumeurs humaines <sup>(35, 263)</sup>.

Enfin, il a été rapporté que la **combinaison** de molécules anti-angiogéniques avec des molécules de chimiothérapie pouvait être synergistique <sup>(264)</sup>. De façon *a priori* paradoxale, les molécules anti-angiogéniques peuvent permettre d'assurer une meilleure délivrance de ces dernières au niveau des tumeurs, en induisant une normalisation des néovaisseaux, qui deviennent ainsi moins perméables et donc plus fonctionnels <sup>(265, 266)</sup>.

### II.3.2 Thérapie anti-néovasculaire

La thérapie anti-néovasculaire est un nouveau mode de traitement visant, non pas à empêcher la formation de nouveaux vaisseaux, mais à détruire les vaisseaux angiogéniques déjà formés <sup>(267)</sup>. L'ANET (*anti-neovascular therapy*) a pour but d'éradiquer les cellules endothéliales proliférantes, et par là-même d'éradiquer les cellules tumorales en bloquant tout apport sanguin en nutriments et en oxygène <sup>(268)</sup>. On distingue trois grandes stratégies : le ciblage vasculaire, la thérapie métronomique et la thérapie photodynamique <sup>(262)</sup>.

#### II.3.2.1 Le ciblage vasculaire

Les cellules endothéliales associées aux tumeurs se divisent 20-2000 fois plus rapidement que les cellules endothéliales normales (sauf dans certains processus d'angiogenèse physiologique déjà cités) <sup>(2, 269)</sup>. Elles expriment des marqueurs que les cellules endothéliales quiescentes n'expriment pas ou faiblement (antigènes, récepteurs aux facteurs de croissance etc.), parmi lesquels : les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , les récepteurs Tie, les récepteurs des éphrines et ceux du VEGF <sup>(269)</sup>, auxquels nous nous intéressons ici.

La destruction des néovaisseaux peut se faire en utilisant des molécules spécifiques des VEGFRs et possédant un potentiel cytotoxique. Il est possible d'utiliser le VEGF lui-même comme molécule ciblante. Dans une étude, de la toxine diphtérique (DT385) a été couplée au VEGF<sub>165</sub> ou au VEGF<sub>121</sub> <sup>(270)</sup>. Ces molécules conjuguées inhibent spécifiquement la prolifération *in vitro* de cellules endothéliales exprimant Flk-1, l'angiogenèse *in vivo* dans

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

un modèle de membrane chorioallantoïde de poulet, et ralentissent la croissance de tumeurs dans un modèle de sarcome de Kaposi murin.

Il est également possible de cibler les néovaisseaux tumoraux par des anticorps<sup>(271)</sup> ou des peptides<sup>(272, 273)</sup>. En particulier, les peptides représentent des molécules intéressantes pour des stratégies de ciblage en raison de leur petite taille et de leur facilité de synthèse<sup>(274)</sup>. Les principaux peptides ciblant un ou plusieurs des récepteurs au VEGF sont présentés dans le *tableau 6* (page 43).

Certains de ces peptides ont été identifiés par des stratégies rationnelles, à partir de la séquence du VEGF, d'autres par des stratégies de *screening*, de type *phage display*, et les peptides concernés peuvent alors ne présenter aucune homologie apparente de séquence en acides aminés avec le VEGF.

Environ la moitié des peptides du *tableau 6* sont reconnus par la NRP-1. Si le ciblage du VEGFR-2, principal récepteur du VEGF en terme de transduction du signal, semble un choix logique, il peut s'avérer également intéressant de cibler les co-récepteurs du VEGF, comme la NRP-1. Des cellules endothéliales en culture comportent environ 3 000 molécules de VEGFR-1 et 40 000 molécules de VEGFR-2<sup>(269)</sup>. Certaines lignées de cancer du sein (MDA-MB-231) ou de la prostate (PC3) expriment de l'ordre de 1 200 000 copies de NRP-1<sup>(207)</sup>; des cellules endothéliales de type HUVEC expriment également ce récepteur, à des taux moins élevés que chez ces cellules, mais la quantité de NRP-1 dans les HUVEC reste certainement élevée<sup>(230)</sup>. Par ailleurs, les récepteurs NRP-1 situés sur les cellules endothéliales peuvent être internalisés<sup>(275)</sup>, comme le VEGFR-2.

Un grand nombre de ces peptides sont des antagonistes du VEGF. Le dogme est de penser que ceux-ci ne représenteraient donc pas de bons candidats pour des stratégie de ciblage, car, s'ils interfèrent avec l'activation du récepteur, ils ne seraient pas internalisés par les cellules. Cependant, certaines études montrent qu'une internalisation de molécules antagonistes est possible<sup>(276, 277)</sup>.

Les affinités des peptides du *tableau 6* pour leur(s) cible(s) sont généralement de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . Les valeurs de  $K_d$  ou de concentration déplaçant 50% du VEGF fixé ( $\text{IC}_{50}$ ), qui caractérisent cette affinité, déterminées dans les différentes études, n'ont pas été reportées dans le *tableau 6*, du fait de la variété de tests utilisés (*i.e.* tests sur récepteurs recombinants ou sur cellules entières), qui rend approximative toute tentative de comparaison.

**Tableau 6. Principaux peptides spécifiques de récepteurs au VEGF (voir liste des abréviations pour les acides aminés).**

Peptide	Cibles	Identification	Agoniste/Antagoniste	Référence
ATWLPPR (V1)	NRP-1, NRP-2	<i>Phage display</i>	Antagoniste	(278)
TKPPR	NRP-1	Dérivé de tuftisine (TKPR)	Antagoniste	(279)
SCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR (EG3287)	NRP-1	VEGF <sub>138-165</sub> (exons 7-8)	Antagoniste	(280)
CSCCKNTDSRCKARQLELNERTCRC-amide	NRP-1	VEGF <sub>137-160</sub> (exon 7)	Antagoniste	(202)
NGYEIEWYSWVTHGMY (SP5.2)	Flt-1	<i>Phage display</i>	Antagoniste	(281, 282)
GNQWFI	Flt-1	<i>Screening de peptides</i>	Antagoniste	(283)
Ac-KLTWQELYQLKYKGI-amide (QK)	KDR, Flt-1	Conception rationnelle à partir du VEGF <sub>17-25</sub> (exon 3)	Agoniste	(272)
SYGRKKRRQRRRAPQ	KDR, Flt-1	HIV TAT 46–60	Agoniste	(284)
HTMYHHYQHHL (K237)	KDR	<i>Phage display</i>	Antagoniste	(285)
WHSDMEWYLLG (F56)	Flt-1	<i>Phage display</i>	Antagoniste	(286)
QKRKRKKSRYKS	KDR, NRP-1	VEGF <sub>125-136</sub> (exon 6)	Antagoniste	(287)
cycle(fPQIMRIKPHQGQHIGE) (Cyclo-VEGI)	KDR, Flt-1	Conception rationnelle à partir du VEGF <sub>79-93</sub> (exon 4)	Antagoniste	(288)
CPQPRPLC	Flt-1, NRP-1	Méthode BRASIL*. Homologies avec le VEGF-B <sub>167</sub> et le VEGF-B <sub>186</sub>		(289)

\*BRASIL: *Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands.*

### II.3.2.2 La thérapie métronomique

Les agents anticancéreux conventionnels sont couramment utilisés à la dose maximale tolérée, ce qui cause des dommages aux cellules en forte prolifération, *i.e.* cellules cancéreuses, mais aussi à certaines cellules normales, comme les cellules hématopoïétiques. Il est alors nécessaire de laisser un temps suffisant entre deux traitements afin de permettre aux cellules normales de reprodiférer, ce qui induit également une reprodifération des cellules tumorales, ainsi qu'une reformation des néovaisseaux tumoraux. Ce type de protocole conduit souvent à de bonnes réponses (diminution du volume tumoral) à court terme, mais est accompagné de sérieux effets secondaires, et d'une reprise de la croissance tumorale. Par ailleurs, des phénomènes de résistance aux agents anticancéreux peuvent survenir <sup>(290)</sup>.

L'idée d'un nouveau protocole d'administration a alors vu le jour, dans lequel des molécules de chimiothérapie sont administrées à doses réduites, répétées à la façon d'un métronome <sup>(291)</sup>. La chimiothérapie métronomique permet d'éviter l'apparition de résistance à l'agent anticancéreux et diminue sa toxicité. Il est dit que, de cette façon, les molécules ciblent les cellules endothéliales en forte prolifération, et induisent leur apoptose, ce qui conduit ensuite à une régression tumorale. Les données précliniques suggèrent que la thérapie métronomique serait plus efficace en combinaison avec un agent anti-angiogénique <sup>(292, 293)</sup>.

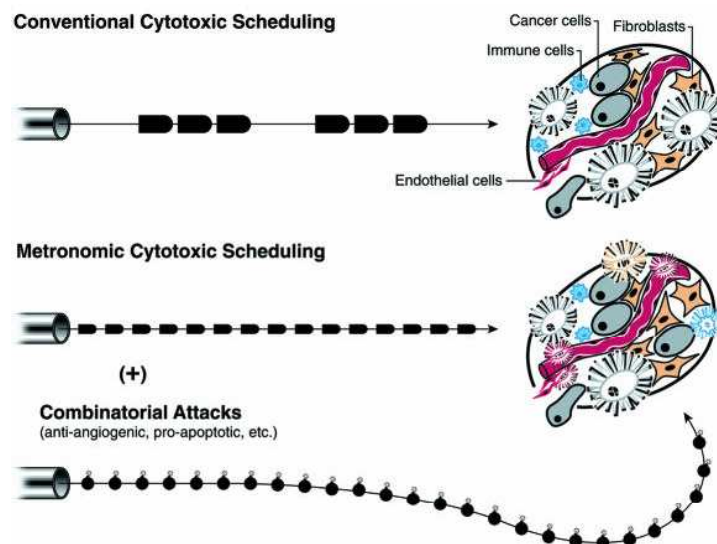


Figure 11. Comparaison du protocole de chimiothérapie traditionnel avec le protocole métronomique, en combinaison ou non avec d'autres molécules <sup>(294)</sup>. Les «balles» font référence aux doses de chimiothérapie, qui peuvent être élevées et répétées de façon épisodique (schéma du haut) ou plus faibles et métronomiques (schéma du bas) ; les «bombes» représentent d'autres agents anticancéreux pouvant apporter des effets bénéfiques additifs ou synergistiques avec la thérapie métronomique.



### II.3.2.3 La thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) utilise la combinaison d'une molécule, le photosensibilisateur, avec de la lumière visible destinée à l'activer ; des réactions photochimiques avec l'oxygène vont alors se produire et générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO), très cytotoxiques, qui vont conduire à une destruction tumorale. La PDT ne cause pas de myélosuppression, comme cela est observé avec la chimiothérapie, du fait du caractère localisé de la génération des espèces cytotoxiques. Par ailleurs, le traitement peut être répété, alors que cela n'est pas possible avec la chirurgie ou la radiothérapie.

Outre cette application dans la thérapie anticancéreuse, la PDT est notamment utilisée pour traiter des pathologies associées à une angiogenèse anormale, telles que la DMLA. L'activation par la lumière d'un dérivé de benzoporphyrine dans une formulation liposomale (Visudyne®) induit des dommages au niveau de l'endothélium néovasculaire, résultant en une occlusion vasculaire par agrégation plaquettaire, formation d'un caillot de fibrine et vasoconstriction <sup>(295)</sup>.

Le principe et les mécanismes mis en jeu lors de la PDT sont détaillés dans la partie suivante. Il est intéressant de noter que des stratégies mixtes ont également été utilisées, comme la PDT avec ciblage vasculaire ou la PDT métronomique <sup>(296)</sup>.

## II.4 LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)

### II.4.1 Historique

Le phénomène phototoxique fut analysé pour la première fois à la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, suite à des études d'Oscar Raab utilisant l'acridine <sup>(297)</sup>. Ce n'est qu'au cours des années 1970 que la PDT a connu un essor, avec les expérimentations de Thomas Dougherty. Des traitements à base d'hématoporphyrine dérivée (HpD) et de lumière rouge ont montré de très bons résultats lors d'études précliniques et cliniques <sup>(298)</sup>. L'HpD est le produit de purification de l'hématoporphyrine, constituée d'un mélange complexe de porphyrines et d'impuretés <sup>(299)</sup>. L'HpD a notamment donné naissance à une fraction enrichie en composés actifs, le porfimer sodium ou Photofrin®, constitué d'un mélange de porphyrines présentes dans différents états ou des associations chimiques différentes (monomères, dimères et oligomères, liaisons éthers et esters) <sup>(300)</sup>. Les principales molécules (photosensibilisateurs ou agents photosensibilisants, PS) utilisées pour la PDT ayant obtenu une AMM sont présentées dans le *tableau 7*. La structure chimique de ces PS est présentée sur la *figure 12*.

**Tableau 7. Caractéristiques des principaux photosensibilisateurs ayant une AMM <sup>(301)</sup>.**

Molécule	$\lambda_{\text{max}}$ absorption	Dose de PS (mg/kg)	Intervalle Drogue- Lumière (h)	Fluence (J/cm <sup>2</sup> ), Irradiance (J/cm <sup>2</sup> )	Indications
Porfimer sodium (Photofrin®, Axcan Pharma)	630 nm	2	48-72	100-200, 100	Rechute de cancer du poumon non à petites cellules et de l'œsophage (AMM en France en 1996)
Acide 5-aminolévulinique/ALA (Levulan®, DUSA Pharmaceuticals) et ses esters (Metvix®, Photocure), précurseurs de la Protoporphyrine IX (PpIX)	635 nm (PpIX)	20%, topique	3-6	100, 100-150	Levulan® : kératoses actiniques (approuvé par la FDA an 2000) ; Metvix® : kératoses actiniques et carcinome basocellulaire (AMM européenne en 2000)
méso-TétraHydroxyPhényl Chlorine (mTHPC) ou Témoporfine (Foscan®, Biolitec)	652 nm	0,1-0,15	96	10-20, 100	Cancers de la tête et du cou (AMM en Europe, Norvège et Islande : 2001)
<i>Benzoporphyrine derivative monoacid ring A</i> (BPD-MA) ou Verteporfin (Visudyne®, Novartis)	690 nm	0,2-0,6	0,1-0,25	50-100, 600	DMLA dans sa forme exsudative (AMM en 2002)

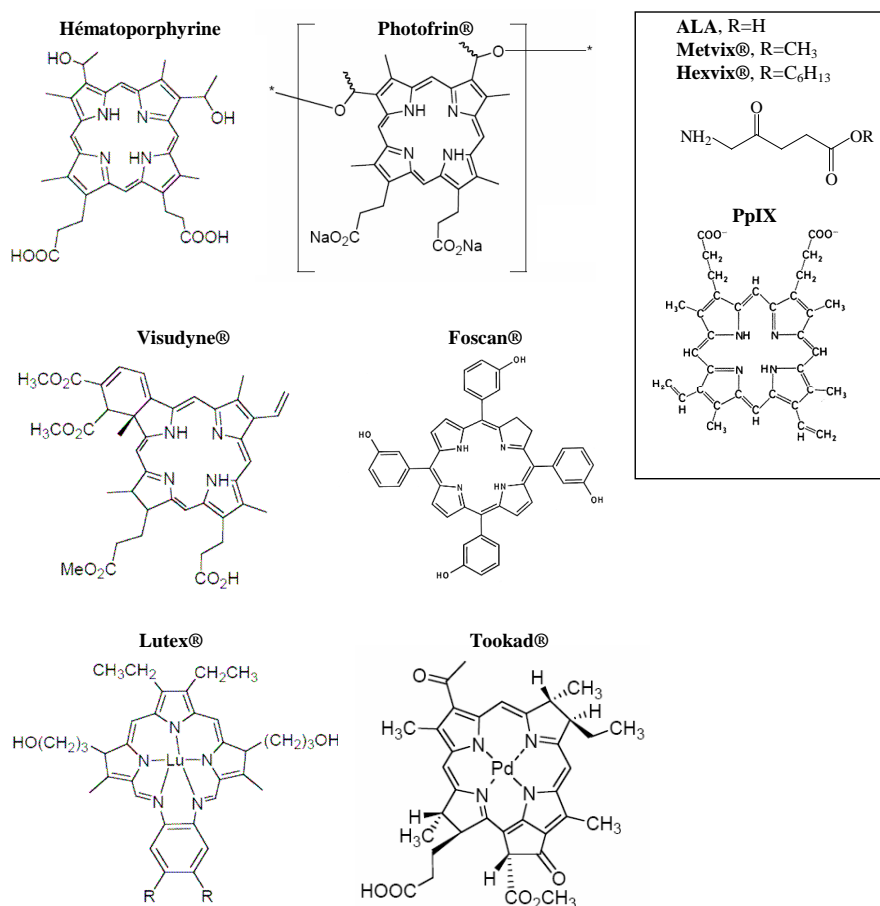


Figure 12. Structure chimique des principaux PS.

## II.4.2 Principe

Dans la PDT, une molécule, le **PS**, non cytotoxique à l'obscurité, va être activée suite à une **irradiation lumineuse** de longueur d'onde adéquate, et générer, en présence d'**oxygène** moléculaire, des espèces fortement cytotoxiques pour les cellules tumorales environnantes, en particulier de l'oxygène singulet<sup>(302, 303)</sup>.

Dans le cas d'un traitement anticancéreux, le PS est donc **dans un premier temps** administré au patient, le plus souvent par voie intraveineuse (i.v.). Il peut également être appliqué localement pour un traitement de lésions superficielles, notamment cutanées, que ce soient des pathologies cancéreuses (kératoses actiniques et maladie de Bowen, stade précoce des carcinomes spinocellulaires) ou dermatologiques non cancéreuses (psoriasis, acné et photo-rajeunissement cutané). Une application topique nécessite cependant l'utilisation de molécules de poids moléculaire suffisamment bas pour passer la barrière cutanée, tels les dérivés de l'ALA (Acide 5-aminolévulinique), précurseurs de la protoporphyrine IX (PpIX).

## Partie II : Synthèse bibliographique

Une fois dans le sang, le PS se lie à certaines protéines plasmatiques (lipoprotéines, albumines), en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, qui le convoient vers les différents tissus. Cette distribution se fait, dans l'idéal, préférentiellement vers les tissus néoplasiques.

Dans un deuxième temps, après un certain délai suivant l'administration, pouvant aller de quelques minutes à plusieurs jours, en fonction des caractéristiques pharmacocinétiques du PS et de l'application clinique, la tumeur est illuminée localement par une lumière visible, si possible monochromatique, dont la longueur d'onde correspond à un maximum d'absorption du PS <sup>(304)</sup>. On utilise généralement un rayonnement laser, guidé jusqu'à la tumeur *via* une fibre optique et un diffuseur de lumière.

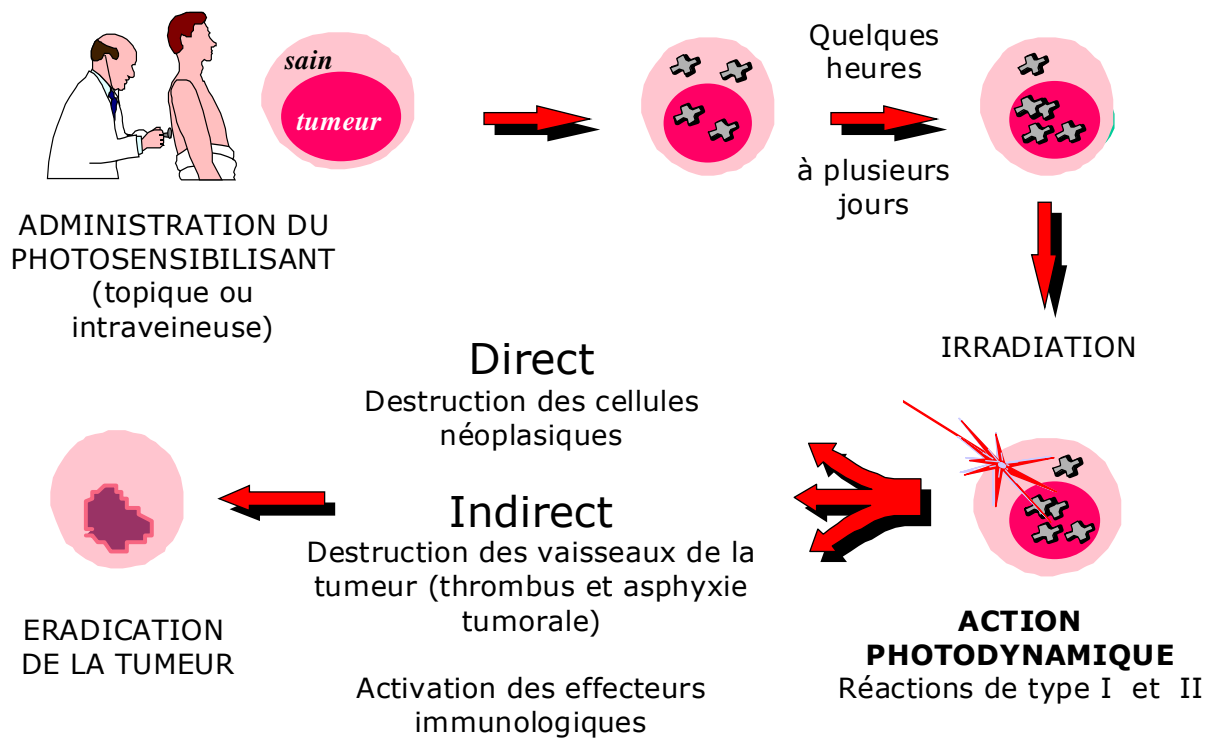


Figure 13. Schéma résumant le principe de la PDT. Après administration, le PS s'accumule idéalement de façon préférentielle au niveau du tissu tumoral. Lorsque cette concentration est maximale (de quelques heures à plusieurs jours après l'administration, selon les caractéristiques pharmacocinétiques du PS), une irradiation lumineuse est appliquée localement au niveau de la tumeur. Des réactions photochimiques du PS activé avec l'oxygène vont alors conduire à une éradication tumorale, par différents mécanismes, directs ou indirects.

Comparé à la radiothérapie, le rayonnement utilisé par la PDT, de moindre énergie, est inoffensif en tant que tel et non mutagène <sup>(300)</sup>. La sélectivité de la PDT pour les tissus cibles (*e.g.* tissu tumoral) résulte <sup>(300)</sup> :

- du caractère localisé de l'irradiation lumineuse au niveau du site tumoral,

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

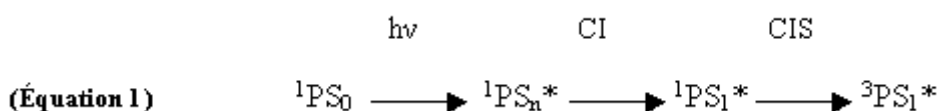
- de la localisation souvent préférentielle des PS dans les tissus tumoraux,
- et, de la faible durée de vie de l'oxygène singulet : celui-ci est en effet désactivé avant de pouvoir diffuser hors de la cellule dans laquelle il a été produit.

Par conséquent, la PDT ne peut pas être à l'origine d'effets secondaires tels que ceux provoqués par la chimiothérapie (e.g. chute des cheveux, toxicités hématologiques).

Du fait de l'utilisation d'une lumière peu pénétrante dans les tissus, la PDT est surtout appliquée actuellement pour des tumeurs accessibles directement (tumeurs cutanées) ou par voie endoscopique (œsophage, vessie), mais il est également possible de traiter des tumeurs solides (e.g. prostate, pancréas, foie) en insérant les fibres optiques directement dans la tumeur (PDT interstitielle)<sup>(305)</sup>. La PDT est actuellement utilisée en traitement curatif des cancers superficiels à des stades précoces ou en traitement palliatif (après échec de la radiothérapie et de la chirurgie).

### II.4.3 Les réactions photochimiques

Le PS est initialement dans son état fondamental, qui est un état singulet ( $^1\text{PS}_0$ ). L'absorption d'un photon (d'énergie  $h\nu$ ) provenant d'un rayonnement lumineux de longueur d'onde appropriée le fait passer à un état électronique excité ( $^1\text{PS}_1^*$ ,  $^1\text{PS}_2^*$  ou  $^1\text{PS}_3^*$ ...), puis, dans tous les cas, à l'état électronique excité de plus bas niveau d'énergie  $^1\text{PS}_1^*$ , par une succession de relaxations vibrationnelles (conversions internes, CI). Il peut alors se produire un retournement de spin, qui, suite à de nouvelles CI, va mener à la formation de l'état triplet excité du PS ( $^3\text{PS}_1^*$ ). On parle de conversion inter-systèmes (CIS). A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité ( $^3\text{PS}_1^*$ ) et l'état singulet fondamental ( $^1\text{PS}_0$ ), transition dite interdite.



Par conséquent, la durée de vie de cet état triplet  $^3\text{PS}_1^*$  est beaucoup plus longue (1  $\mu\text{s}$  à 1 s, en fonction de l'environnement de la molécule) que celle de l'état singulet (de l'ordre de la ns). Le PS dans son état triplet excité est donc très réactif et peut interagir avec les molécules qui l'avoisinent. Il est à l'origine des réactions photochimiques de types I et II. Le

## Partie II : Synthèse bibliographique

mécanisme de type I implique l'interaction directe du PS à l'état excité triplet avec le substrat cellulaire (S), alors que dans un processus de type II, le PS à l'état excité réagit d'abord avec l'oxygène moléculaire pour former des ERO susceptibles d'initier d'autres réactions avec les substrats cellulaires <sup>(306)</sup> (Figure 14).

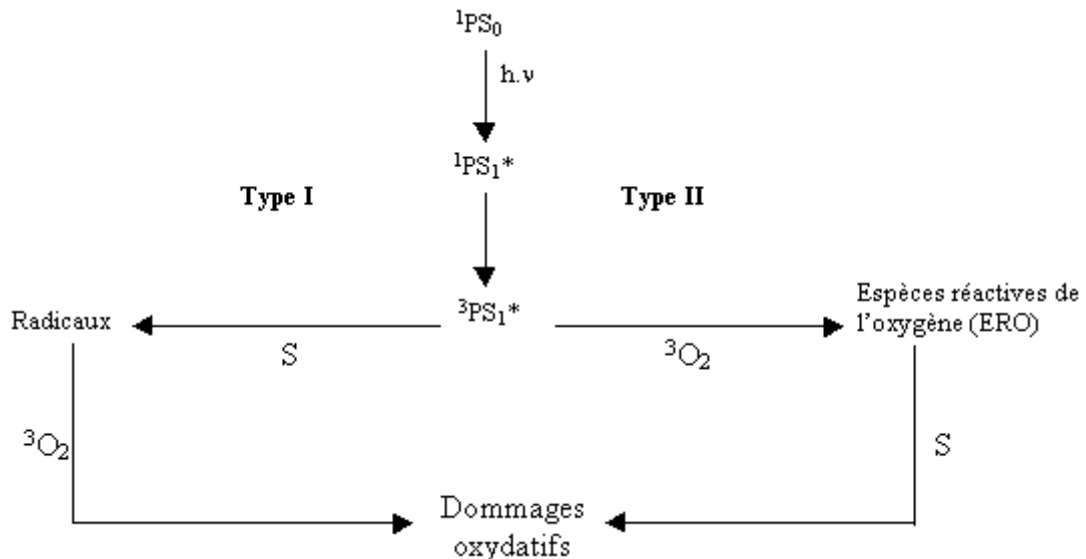
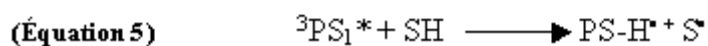
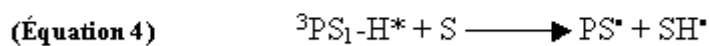
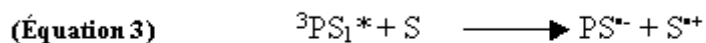
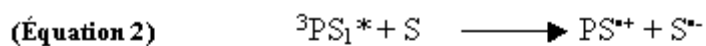


Figure 14. Les réactions photochimiques de types I et II faisant intervenir le PS à l'état triplet suite à son activation par la lumière.

### II.4.3.1 Les réactions photochimiques de type I

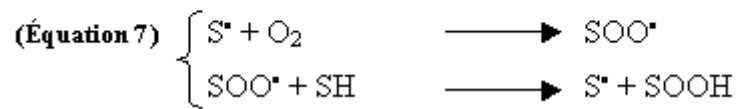
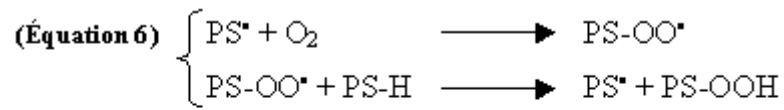
Dans les réactions photochimiques de type I, des radicaux libres ou des ions radicaux sont produits, suite au **transfert d'un électron** (Equation 2 ou 3) ou d'un **atome d'hydrogène** (Equation 4 ou 5) entre le PS à l'état triplet et le substrat S.



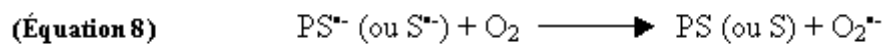
Les espèces radicalaires générées peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation (Equation 6 ou 7).

## Partie II : Synthèse bibliographique

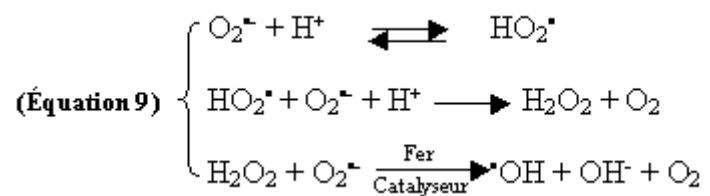
---



Les anions radicaux du PS ou du substrat peuvent également interagir de manière efficace avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion radical superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Equation 8).



$\text{O}_2^{\bullet-}$  peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres ERO (Equation 9). Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et du radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ). En conditions physiologiques,  $\text{H}_2\text{O}_2$  est produit par la dismutation de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , dont le principe repose sur la protonation de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  pour former son acide conjugué  $\text{HO}_2^{\bullet}$ , suivie par la réaction de  $\text{HO}_2^{\bullet}$  avec  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Le radical hydroxyle peut alors être produit au cours de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$  et l'anion superoxyde  $\text{O}_2^{\bullet-}$ .



Les différentes ERO formées au cours des réactions photochimiques de type I ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\cdot\text{OH}$ ) représentent de puissants oxydants pour une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou encore les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine)<sup>(307)</sup>.

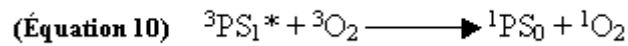
### II.4.3.2 Les réactions photochimiques de type II

Les réactions photochimiques de type II requièrent la présence d'oxygène dès les premières étapes du processus. Suite aux mêmes étapes initiatrices que pour les réactions de type I, le PS se retrouve à l'état triplet excité  $^3\text{PS}_1^*$ . Il s'agit ici, non pas d'un transfert

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

d'électron ou d'hydrogène, mais d'un **transfert d'énergie** vers l'oxygène moléculaire. Fait remarquable, l'oxygène moléculaire à son état fondamental se trouve à l'état triplet ( $^3\text{O}_2$ ), du fait de la présence de deux électrons célibataires dans sa couche externe. Le PS à l'état triplet va lui transmettre l'énergie qu'il a emmagasinée, et le faire passer à un état singulet excité ( $^1\text{O}_2^*$  ou  $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ ), tandis que lui-même va retrouver son état fondamental (*Equation 10*).



Cette réaction n'est possible que si l'énergie de  $^3\text{PS}_1^*$  est supérieure à l'énergie  $E_\Delta$  de  $^1\text{O}_2^*$ , qui est de 94,5 kJ/mole<sup>(308)</sup>. L'oxygène singulet  $^1\text{O}_2^*$  peut revenir à son état fondamental par émission de luminescence (1270 nm). Il est très réactif et susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son proche environnement (distance inférieure à 10-45 nm<sup>(309)</sup>, pour une durée de vie de l'oxygène singulet de l'ordre de la  $\mu\text{s}$  dans les milieux aqueux, et de 25-100  $\mu\text{s}$  dans les milieux organiques non polaires, qui constituent un modèle des régions lipidiques des cellules<sup>(310)</sup>). Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec l'oxygène singulet<sup>(311)</sup>.

De façon similaire, l'oxygène singulet peut également réagir avec le PS à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation, dits photoproduits (phénomène de photoblanchiment ou de photomodification), dont certains peuvent eux-mêmes être phototoxiques. Il a souvent été rapporté que les réactions de type II étaient prépondérantes lors du processus de PDT, et nous considérerons uniquement cette catégorie de réactions par la suite.

Un PS sera d'autant plus intéressant pour la PDT que son coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde utilisée sera grand (pour une absorption optimale de la lumière), que son rendement quantique en état triplet sera élevé et que la durée de vie de cet état sera longue<sup>(312)</sup>. D'après le diagramme de Jablonski (*Figure 15*), cet état triplet  $^3\text{PS}_1^*$  est formé à partir de l'état singulet  $^1\text{PS}_1^*$ , et on peut noter que deux processus entrent en compétition avec la formation de  $^3\text{PS}_1^*$  : la désactivation non radiative et la fluorescence. Si le processus de désactivation non radiative doit idéalement être négligeable, il n'est pas inintéressant que le PS ait un rendement quantique de fluorescence assez élevé. Cette propriété de fluorescence des PS peut être mise à profit pour la détection et l'imagerie des tumeurs.



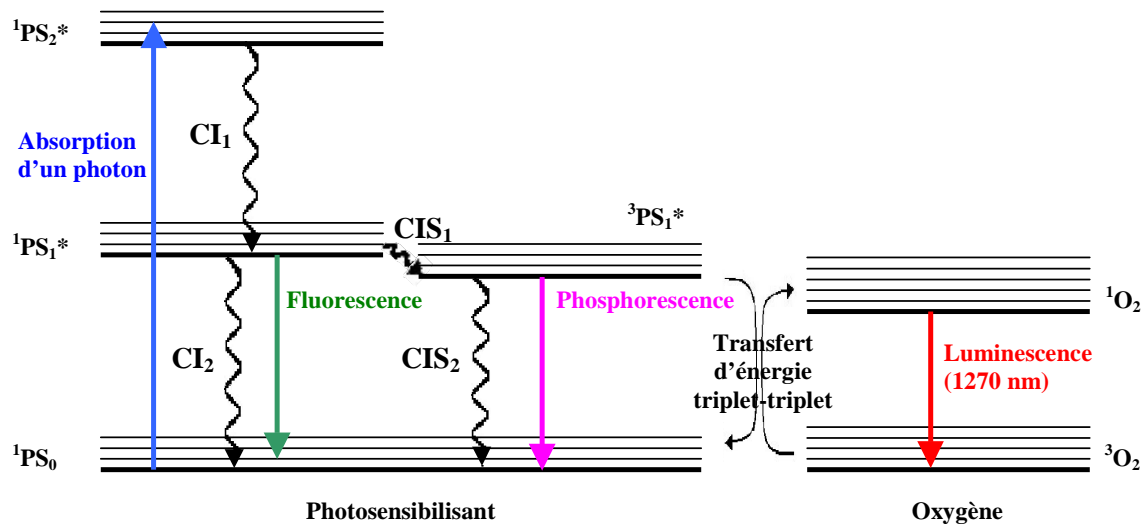
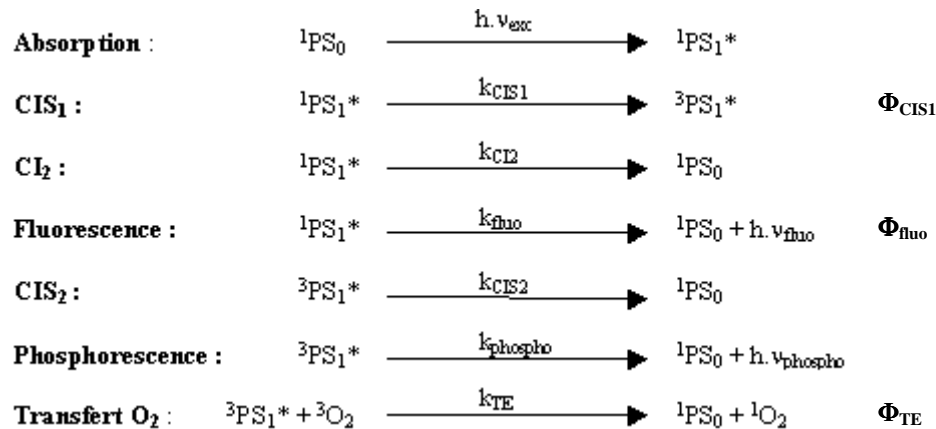


Figure 15. Diagramme de Jablonski.

Mais le paramètre le plus important est sans doute le rendement quantique de production d'oxygène singulet ( $\Phi_{\Delta}$ ), espèce produite suite à la formation de l'état triplet du PS. L'ensemble des réactions en jeu dans la PDT peut être résumé par :



On peut en déduire le rendement quantique d'oxygène singulet (nombre de molécules de  ${}^1\text{O}_2^*$  générées / nombre de photons absorbés) :

(Équation 11)  $\Phi_{\Delta} = \Phi_{\text{CIS1}} \cdot \Phi_{\text{TE}}$

où :  $\Phi_{\text{CIS1}}$  est le rendement quantique de production de  ${}^3\text{PS}_1^*$

$\Phi_{\text{TE}}$  est la probabilité du transfert d'énergie de  ${}^3\text{PS}_1^*$  à l'oxygène moléculaire  ${}^3\text{O}_2$ , induisant la formation d'oxygène singulet.

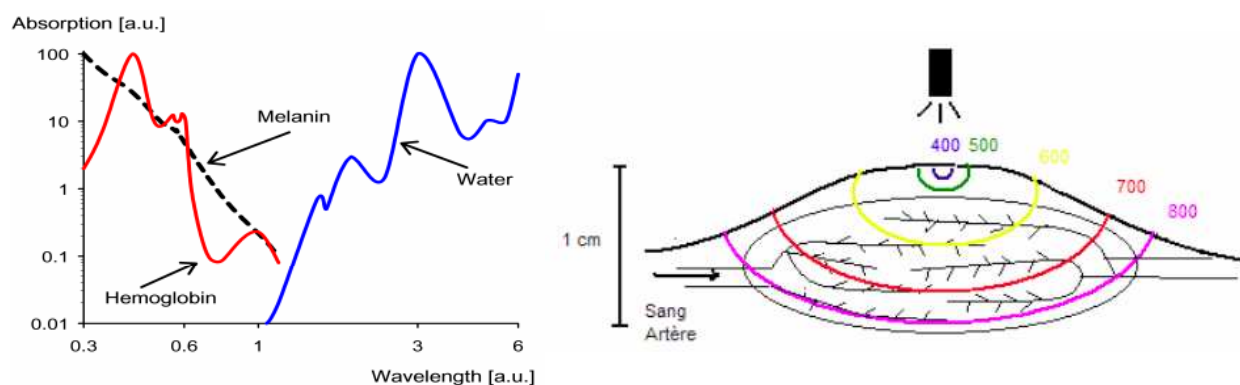
### II.4.4 Le photosensibilisateur idéal

L'utilisation du Photofrin® présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, c'est un mélange complexe dont la composition est difficile à reproduire, ce qui complexifie les études mécanistiques de type pharmacocinétique/pharmacodynamie. De plus, il possède un faible coefficient d'extinction molaire dans le rouge et induit une photosensibilisation cutanée de plusieurs semaines du fait de sa faible sélectivité et de sa clairance lente.

Cela a conduit à la définition du PS idéal, qui devra posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques suivantes :

- **Pureté chimique**, composition constante, facilité de synthèse ;
- **Toxicité à l'obscurité faible**, voire nulle ;
- **Caractéristiques photophysiques intéressantes** ;
  - **coefficient d'extinction molaire élevé**, à des longueurs d'onde situées dans la «fenêtre thérapeutique», c'est-à-dire décalé dans la région **rouge** du spectre de la lumière visible, voire dans le proche infrarouge (600-850 nm) (*Figure 16*), afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales ;
  - **rendement quantique en oxygène singulet élevé** ( $\Phi_{\Delta}$ ) ; pour ce faire, le rendement quantique en état triplet du PS ( $\Phi_{CIS1}$ ) doit être élevé ; la durée de vie de  $^3PS_1^*$  doit être élevée, et son énergie suffisante pour permettre le transfert d'énergie à l'oxygène de façon la plus efficace possible (caractérisé par  $\Phi_{TE}$ ) ;
- **Solubilité** dans l'eau, afin de faciliter l'administration systémique ;
- **Clairance rapide** ;
- **Et, sélectivité** pour le tissu tumoral.

## Partie II : Synthèse bibliographique



**Figure 16. Pénétration de la lumière dans les tissus. A gauche : Spectres d'absorption des principales molécules biologiques. A droite : Profondeur de pénétration de la lumière dans un tissu en fonction de sa longueur d'onde (en nm).**

Afin de se rapprocher des caractéristiques de ce PS idéal, de nouveaux PS, dits de 2<sup>ème</sup> génération, sont apparus. Une majorité de PS testés en clinique possèdent une structure tétrapyrrolique (porphyrines et chlorines). Les chlorines et les bactérochlorines résultent de la simple ou double réduction de liaison d'une porphyrine, respectivement. Des essais cliniques sont actuellement en cours pour des molécules possédant une forte absorption dans le proche infrarouge. Citons par exemple le palladium bactériophéorbide (WST09, Tookad®), co-développé par l'institut Weizmann en Israël, Steba Biotech et Negma-Lerads. Le Tookad® possède un maximum d'absorption à 763 nm, et est actuellement en essais cliniques de phase II pour le cancer de la prostate<sup>(313)</sup>.

Il est souvent rapporté que les PS se localisent préférentiellement au niveau des tissus tumoraux, comparé aux tissus sains. La prolifération rapide des tumeurs et leur physiologie anormale (*e.g.* faible drainage lymphatique, fenestration des vaisseaux tumoraux, pH acide causé par une augmentation du métabolisme des sucres, augmentation du nombre de récepteurs aux LDLs (*low density lipoproteins*), abondance des macrophages) semblent y jouer un rôle<sup>(300)</sup>. Cependant, des progrès restent à faire pour améliorer la sélectivité des PS, qui ont notamment tendance à s'accumuler au niveau de la peau. Cela contraint les patients à limiter leur exposition à la lumière pendant plusieurs semaines, le temps de permettre l'élimination du PS. Ceci a conduit à l'apparition des PS de 3<sup>ème</sup> génération : ce sont des PS de 2<sup>ème</sup> génération, modifiés de manière à cibler de façon active les cellules tumorales. Ces modifications se traduisent par une addition de groupements chimiques (anticorps, ligands, sucres, protéines, toxine de Shiga), qui ont une affinité particulière pour des antigènes ou des récepteurs sur-exprimés à la surface de ces cellules<sup>(314, 315)</sup>. Par la suite, la mise en évidence

de l'importance de l'effet anti-vasculaire, notamment, pour une éradication tumorale efficace par PDT, a conduit au développement de PS se localisant au niveau des vaisseaux sanguins<sup>(274)</sup>. Les mécanismes de destruction tumorale sont détaillés ci-après.

### II.4.5 Les mécanismes de destruction tumorale après PDT

La PDT peut induire une régression tumorale par l'action combinée de divers mécanismes : un effet direct de destruction des cellules tumorales, et des effets indirects, associant destruction des vaisseaux tumoraux (et régression consécutive de la tumeur par asphyxie) à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

On estime qu'il est nécessaire d'avoir une combinaison de ces effets pour le contrôle des tumeurs à long terme<sup>(303)</sup>. La prépondérance de l'un ou l'autre de ces effets va dépendre du type de tumeur, du PS (caractéristiques pharmacocinétiques, localisation intratissulaire et intracellulaire etc.) et des conditions de PDT utilisées<sup>(316, 317)</sup>.

#### II.4.5.1 Effet direct

Suivant le protocole de PDT, une partie plus ou moins importante du PS peut être présente dans les cellules tumorales au moment de l'irradiation. Les espèces cytotoxiques produites vont alors causer des dommages cellulaires, conséquence de l'altération des fonctions des organites cellulaires et des systèmes membranaires. Les dommages se traduisent par deux effets principaux : la nécrose et l'apoptose. L'orientation vers l'un ou l'autre type de mort cellulaire dépend de la lignée tumorale, mais aussi de la localisation intracellulaire du PS<sup>(309)</sup>, et des doses de lumière et de PS utilisées<sup>(317-319)</sup>.

La **nécrose** est un processus de dégénérescence passif. La dégradation oxydante des lipides membranaires cause la perte de l'intégrité membranaire. La cellule gonfle à cause d'une entrée massive d'eau et d'électrolyte, et des enzymes sont libérées dans le cytoplasme, aboutissant à la nécrose. La cellule libère son contenu, ce qui peut être à l'origine d'une réaction inflammatoire<sup>(317)</sup>.

L'**apoptose** correspond à une mort cellulaire programmée de la cellule, contrôlée par des signaux intra- et extra-cellulaires (*e.g.* libération de cytochrome *c* et TNF $\alpha$ , respectivement), conduisant à des modifications biochimiques et morphologiques. La mitochondrie est considérée comme l'organite central de ce mécanisme. Elle va subir plusieurs modifications majeures : relargage du cytochrome *c* dans le cytoplasme, diminution du potentiel membranaire etc. L'activation de caspases effectrices (*e.g.* caspase-3) qui en résulte <sup>(318)</sup> induit l'autodestruction cellulaire en clivant des composantes essentielles au maintien de la vie cellulaire. Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases. La membrane plasmique va bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques, renfermant une partie du cytoplasme de la cellule, qui sont ensuite relargués, et vont être phagocytés par les cellules voisines ou les monocytes. L'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire.

De récentes études ont montré l'implication d'un autre type de mort cellulaire programmée, l'**autophagie**, du grec *autos* (soi-même) et *phagein* (manger) <sup>(320-322)</sup>, suite à la PDT. Cette auto-digestion se fait par l'entremise des lysosomes, qui contiennent un grand nombre d'enzymes qui dégradent la plupart des macromolécules biologiques.

### II.4.5.2 Effets indirects

#### II.4.5.2.1 L'effet anti-vasculaire

L'effet anti-vasculaire semble être le mode d'action principal de certains PS <sup>(323)</sup>, comme la Visudyne® (molécule active : verteporfine ou BPD-MA) ou le Tookad® <sup>(324)</sup>. Le degré de réponse vasculaire semble être fortement dépendant des conditions de PDT utilisées, en terme de quantité de PS administrée, d'intervalle drogue-lumière (IDL) et de dose de lumière <sup>(323, 325-327)</sup>.

##### II.4.5.2.1.1 Mécanisme

Deux événements initiateurs potentiels de l'effet anti-vasculaire ont été décrits, conduisant chacun à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin et hémorragie <sup>(328)</sup>.

- Les dommages directs aux cellules endothéliales comme événement initiateur

Il est généralement considéré que l'événement initiateur de la cascade physiologique de réponses conduisant à la stase vasculaire implique des perturbations et des dommages aux cellules endothéliales durant l'irradiation lumineuse<sup>(329)</sup>. Suite à leur injection i.v., certains PS vont s'incorporer à divers degrés dans ces cellules, et l'irradiation lumineuse va induire des dommages au sein de celles-ci<sup>(328)</sup>. Les cellules endothéliales ne semblent pas intrinsèquement plus sensibles à la PDT que d'autres types cellulaires<sup>(330)</sup>, mais elles sont exposées à des doses de PS et d'oxygène plus élevées. La PDT peut rapidement induire (quelques minutes après le début de l'irradiation), et même à des doses sublétales, une dépolymérisation des microtubules et la formation de fibres de stress d'actine<sup>(331, 332)</sup>. Cette altération des protéines du cytosquelette modifie la forme des cellules endothéliales, qui s'arrondissent et se contractent. L'interruption des jonctions cellulaires qui en résulte conduit à une **augmentation de la perméabilité vasculaire**, donc à la fuite des éléments du sang hors des vaisseaux et à une diminution de la perfusion tumorale<sup>(325, 331)</sup>.

Par ailleurs, la mise à nu de la membrane basale associée à l'altération de l'endothélium<sup>(323)</sup> va induire l'activation des **plaquettes**, qui changent de forme, s'agrègent et adhèrent à la paroi vasculaire, par l'intermédiaire du thromboxane (Tx)<sup>(327)</sup>. Le Tx est une prostaglandine vasoconstrictrice au pouvoir agrégeant de la famille des eicosanoïdes, synthétisées à partir de l'acide arachidonique par les COX. Une libération massive de Tx a ainsi été observée chez le rat suite à un traitement photodynamique avec le Photofrin®, avec des taux circulants pouvant atteindre jusqu'à quatre fois les taux circulants avant PDT<sup>(327, 333)</sup>. Chez des rats thrombocytopéniques, un traitement photodynamique avec le Photofrin® n'induit pas de modification vasculaire significative, alors que, dans des conditions identiques de traitement, une réduction du diamètre luminal et des fuites vasculaires sont observées chez des animaux possédant des taux normaux de plaquettes<sup>(334)</sup>.

L'exposition de la membrane basale induit également l'adhésion des **neutrophiles polynucléaires**<sup>(323, 327)</sup>, et des **globules rouges**<sup>(331)</sup>, ce qui contribue à réduire le diamètre luminal et permet d'aboutir à une thrombose et une stase vasculaire.

Des phénomènes de **constriction des artérioles** peuvent également être observés rapidement après le début de l'irradiation (la constriction des veinules, en grande majorité dépourvues de CML, est quant à elle plus tardive et plus limitée)<sup>(327, 335)</sup>.

- Rupture de l'équilibre entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs comme événement initiateur

Il a été montré que certains nouveaux dérivés hydrosolubles de bactériochlorophylle, de la famille du Tookad® (WST09), tels que WST11, n'induisent pas de dommages directs au niveau des cellules endothéliales, mais conduisent à une occlusion vasculaire. Ces PS ont tendance à rester localisés dans le plasma, sans diffuser dans les tissus, ni s'incorporer dans les cellules endothéliales.

La quantité et la nature des ERO formées au cours de l'irradiation dépendent très fortement du micro-environnement du PS. Si dans des solvants organiques, c'est principalement l'oxygène singulet qui est formé, les dérivés de bactériochlorophylle génèrent principalement des espèces radicalaires (radicaux hydroxyles, superoxydes, et peut-être également peroxydes d'hydrogène) dans les milieux aqueux <sup>(336)</sup>. Celles-ci interagiraient rapidement avec les radicaux de NO du micro-environnement tumoral.

NO est un facteur vasodilatateur, anti-coagulant, permettant d'éviter la thrombose des vaisseaux tumoraux. Son oxydation par les ERO rompt alors l'équilibre préexistant au sein des vaisseaux tumoraux entre facteurs pro- et anti-coagulants. Parallèlement, les produits générés (principalement le peroxyde nitrique,  $\text{ONO}_2$ ) induisent l'apoptose des cellules endothéliales et la formation de caillots sanguins conduisant à l'occlusion vasculaire <sup>(336)</sup>. La privation des cellules tumorales en oxygène et nutriments, associée à une deuxième vague de radicaux, conduit à une nécrose puis à une cure tumorale.

De nombreuses études montrent le rôle prépondérant de l'effet anti-vasculaire dans l'éradication de la tumeur par PDT <sup>(337, 338)</sup>. Se pose alors la question de savoir comment favoriser cet effet anti-vasculaire.

### II.4.5.2.1.2 Potentialisation de l'effet anti-vasculaire

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la PDT, soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des PS avec un mode d'action vasculaire.

- Optimisation du protocole de PDT

- *Diminution de l'IDL*

Suite à l'injection i.v. du PS, celui-ci se localise initialement au niveau du compartiment vasculaire (plasma, puis endothélium) et peut ensuite diffuser dans les cellules tumorales. Par conséquent, une irradiation à un IDL court aura tendance à favoriser l'effet anti-vasculaire de la PDT. L'IDL favorisant l'effet anti-vasculaire peut varier de quelques minutes à quelques heures en fonction des propriétés pharmacocinétiques du PS.

Ainsi, le Tookad® induit des dommages vasculaires intenses avec des IDL de l'ordre de 5-10 min, sur différents modèles animaux <sup>(339, 340)</sup>, et ces dommages sont réduits par l'application d'IDL plus longs <sup>(339)</sup>.

L'hypéricine présente une action anti-vasculaire importante 30 min après son injection, au moment où sa concentration est maximale dans les vaisseaux de tumeurs RIF-1 induites chez la souris. Cet effet anti-vasculaire est fortement atténué lorsque le PS se localise de manière diffuse dans les cellules tumorales, 6 heures après son injection <sup>(341, 342)</sup>.

Des études sur un modèle de sac à air dorsal chez la souris avec le BPD-MA ont également montré un fort effet anti-vasculaire avec un IDL court (15 min), comparé à un IDL de 3 heures <sup>(262)</sup>. Chez des rats porteurs de chondrosarcome, traités avec de la BPD-MA (2 mg/kg, i.v.) et irradiés avec de la lumière à 690 nm à 150 J/cm<sup>2</sup>, une stase vasculaire au niveau des vaisseaux tumoraux a été observée par microscopie intravitale pour des IDL courts (entre 5 et 30 min), alors que ces modifications vasculaires n'ont pas été observées pour un IDL plus long, de 180 min <sup>(343)</sup>.

- *Irradiance appliquée*

Le choix de l'irradiance (reflétant la vitesse à laquelle la lumière est appliquée) semble également être un paramètre important pour l'observation d'un effet anti-vasculaire, mais son rôle est moins clair que celui de l'IDL.

Chez des animaux traités avec du Photofrin® (25 mg/kg), la PDT avec un IDL de 24 heures entraîne la modification du diamètre de la lumière des artérioles et des veinules à une irradiance de 75 mW/cm<sup>2</sup> et pas à 50 mW/cm<sup>2</sup> <sup>(323)</sup>. Une étude similaire a été réalisée sur des muscles de rats sains sensibilisés avec de l'ALA (200 mg/kg) et irradiés à 105, 178 ou 300 mW/cm<sup>2</sup> <sup>(335)</sup>. Une diminution du diamètre des veinules et des artères a été mise en évidence immédiatement après initiation du traitement administré aux deux plus fortes irradiances. Les



auteurs ont montré que l'intensité de la vasoconstriction ainsi que l'incapacité des vaisseaux à récupérer étaient proportionnelles à l'irradiance appliquée. Ces résultats suggèrent donc que l'application d'une forte irradiance favoriserait l'effet anti-vasculaire de la PDT. Cependant, d'autres études montrent une corrélation inverse, où de faibles irradiances induisent de plus importants dommages vasculaires <sup>(344, 345)</sup>.

- Conception de nouveaux PS ciblant les cellules endothéliales

Des molécules (protéines, peptides, anticorps) spécifiques d'un récepteur (*e.g.* récepteur au VEGF) ou d'un antigène donné peuvent être couplées à un PS <sup>(274, 314, 315)</sup>, de manière à lui conférer une sélectivité pour les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux, et donc aboutir à une destruction de ceux-ci lors de l'irradiation lumineuse.

Ainsi, le pentapeptide H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH (APRPG) a été isolé par *phage display in vivo* à partir d'une banque de peptides de 15 acides aminés, de par son affinité pour les cellules endothéliales angiogéniques et attaché en surface de liposomes pegylés contenant du BPD-MA <sup>(346)</sup>. Ces liposomes pegylés ornés du peptide s'accumulent dans le tissu tumoral à des degrés similaires à ceux des liposomes pégylés sans peptide (environ 4 fois plus que les liposomes non pegylés, 3 heures après injection). Si la présence du peptide n'influe donc pas sur le taux d'accumulation du PS dans la tumeur, elle agit de façon importante sur sa localisation intratissulaire <sup>(347)</sup>. La présence du peptide permet en effet une accumulation du PS au niveau endothélial et une nette amélioration de l'efficacité photodynamique, par un effet anti-vasculaire <sup>(346)</sup>.

Un autre peptide, H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR), identifié initialement comme spécifique du VEGFR-2 <sup>(278)</sup>, mais reconnaissant en fait la NRP-1 <sup>(348-350)</sup>, a été conjugué à de la vertéporfine modifiée avec un polymère d'alcool polyvinylique (PVA), afin de traiter la DMLA, tout en n'induisant pas de dommages aux photorécepteurs <sup>(351)</sup>.

Dans une stratégie un peu différente, un anticorps reconnaissant non pas des récepteurs situés sur les cellules endothéliales, mais le ligand VEGF, a été couplé à de la vertéporfine. La présence de l'anticorps n'induit pas de changement notable des caractéristiques photophysiques du PS, mais des tests cellulaires n'ont pas montré d'amélioration significative de l'activité photodynamique du PS suite au couplage <sup>(352)</sup>.

### II.4.5.2.2 Les effets inflammatoires et immunitaires

L'**altération de l'endothélium** <sup>(353, 354)</sup>, ainsi que la **mort des cellules tumorales** par apoptose et/ou nécrose <sup>(317)</sup> peuvent être à l'origine d'une réponse inflammatoire et immunitaire (*Figure 17*). L'inflammation souvent observée après PDT semble résulter de l'expression de deux facteurs de transcription, NFκB (*nuclear factor κB*) et AP1 (*activator protein 1*), qui interviennent dans l'activation transcriptionnelle de gènes codant pour des cytokines, des chimiokines et/ou des molécules d'adhésion <sup>(355, 356)</sup>. La PDT peut notamment induire une augmentation des taux circulants de IL-1β, IL-6, MIP(*macrophage inflammatory protein*)-1 et 2 et G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) <sup>(357, 358)</sup>.

En réponse à la sécrétion de certaines de ces molécules, des **neutrophiles** sont recrutés au niveau des tissus lésés <sup>(359)</sup>. Ces cellules phagocytaires seraient activées au niveau du site irradié afin d'éliminer les débris de cellules générés par la PDT (*e.g.* fragments lipidiques résultant de la photooxydation des phospholipides membranaires des cellules tumorales <sup>(360, 361)</sup>), en libérant des ERO et des enzymes lysosomales <sup>(353, 354)</sup>. Korbélik *et al* ont montré que la déplétion de cette population de cellules réduisait de 70% l'effet curatif de la PDT avec le Photofrin®, démontrant l'importante contribution des neutrophiles à l'efficacité du traitement <sup>(362)</sup>.

L'invasion des neutrophiles est rapidement suivie par l'arrivée de mastocytes, qui, en libérant le contenu de leurs granules, peuvent être à l'origine de l'invasion des tissus lésés par d'autres cellules inflammatoires <sup>(359)</sup>, notamment les monocytes et les **macrophages**. Ces derniers participent activement à l'effet curatif de la PDT <sup>(362)</sup>. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont montré que la capacité phagocytaire des macrophages augmente lors de la PDT, en particulier lorsque de faibles doses de PS et de lumière sont administrées <sup>(359, 363, 364)</sup>. Après phagocytose et traitement des débris cellulaires, les macrophages peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'antigènes <sup>(365)</sup>.

Les épitopes présentés en surface des macrophages peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4+, ce qui conduit à la génération de clones de **lymphocytes T** cytotoxiques qui peuvent détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes. La réponse immunitaire systémique qui s'ensuit peut alors induire la destruction des cellules tumorales restantes, la destruction ou la prévention de métastases, par développement d'une

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

réponse immunologique à mémoire, ouvrant la voie à la vaccination *in situ* <sup>(366-369)</sup>. Cette observation a été confirmée par l'impossibilité d'induire la même tumeur une seconde fois chez des rats traités avec succès par PDT une première fois <sup>(370)</sup>. Korbelik *et al* ont également montré que cette immunité tumorale était transposable par greffe de moelle osseuse <sup>(371, 372)</sup>.

La réponse inflammatoire et immunitaire semble jouer un rôle, non dans l'ablation initiale de la tumeur, mais dans la **survie à long terme** des animaux <sup>(362)</sup>, en particulier pour des **conditions de PDT suboptimales**, correspondant à des doses de PDT trop faibles (l'un des trois facteurs : lumière, PS ou oxygène, étant limitant) pour éradiquer directement la tumeur <sup>(317, 345)</sup>. Néanmoins, une réaction inflammatoire excessive peut également avoir des effets néfastes, en induisant notamment une re-angiogenèse <sup>(358)</sup>.

L'ensemble des effets directs et indirects induits par la PDT est représenté sur la *figure 17*.

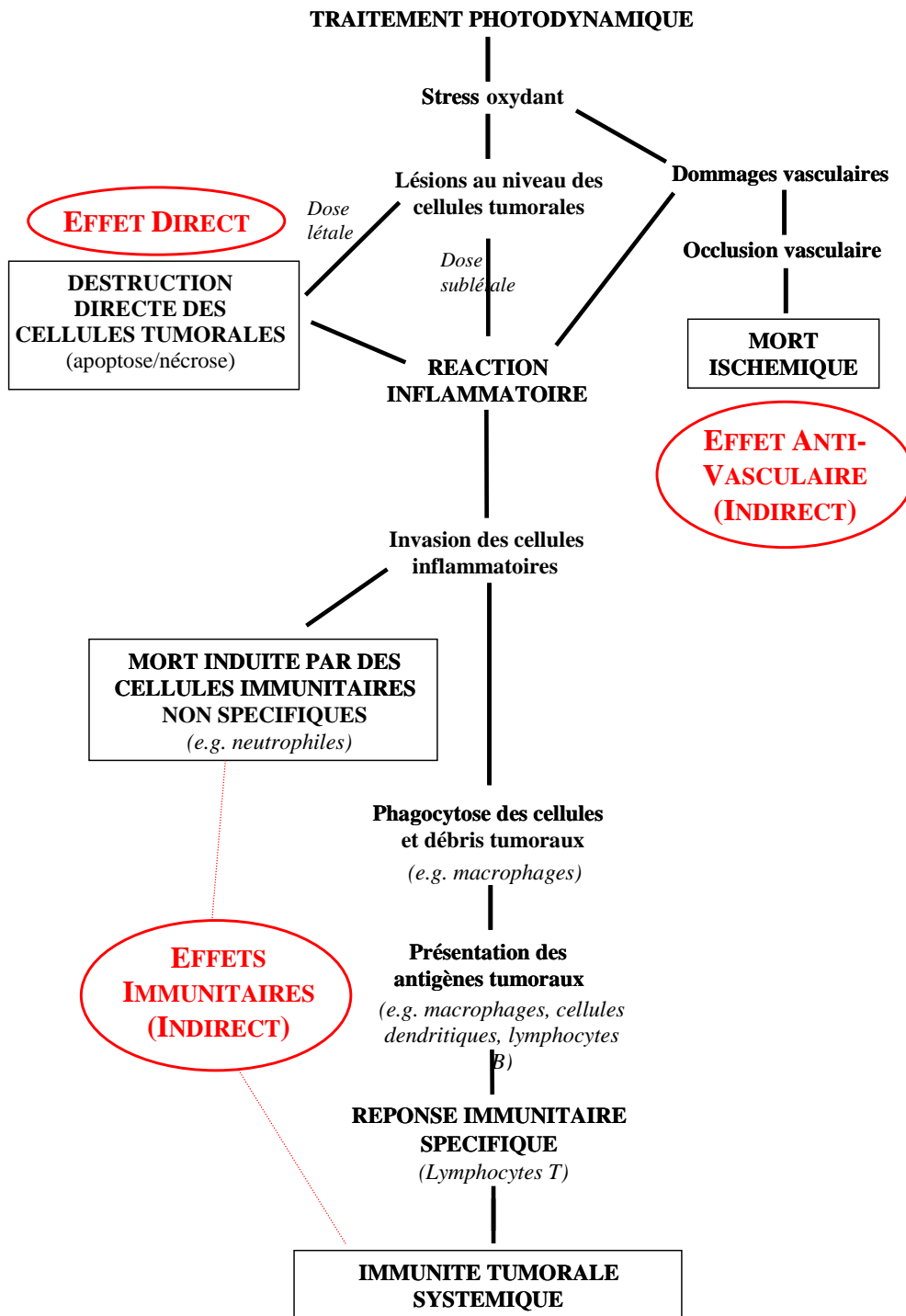


Figure 17. Schéma simplifié des mécanismes de destruction tumorale associés à la PDT (adapté de (354)).

### II.5 MODELES POUR L'EVALUATION DES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES ET ANTI-NEOVASCULAIRES

Le développement de molécules inhibitrices de l'angiogenèse tumorale nécessite l'utilisation de tests précliniques (*in vitro* et *in vivo*). Idéalement, les tests doivent être faciles à réaliser, reproductibles, quantitatifs, peu coûteux et permettre une analyse rapide.

#### II.5.1 Les modèles *in vitro*

Chacune des étapes de l'angiogenèse peut être recréée *in vitro* pour le *screening* de nouvelles molécules. Des cellules endothéliales sont le plus souvent utilisées, du fait du rôle central qu'elles occupent lors du processus angiogénique.

##### II.5.1.1 Choix des cellules endothéliales

Des cellules endothéliales immortalisées sont parfois utilisées, car elles représentent une source «illimitée» de cellules, mais celles-ci peuvent différer des cellules endothéliales *in vivo* en terme de marqueurs moléculaires. Par ailleurs, il n'est pas rare qu'elles soient spontanément activées et donc incapables de répondre convenablement aux stimuli angiogéniques<sup>(373)</sup>.

D'après la littérature, de nombreux types de cellules endothéliales sont utilisés, parmi lesquelles les plus couramment citées sont les HUVEC, dont la source (le cordon ombilical) est d'accès facile. Pour des raisons similaires, l'utilisation de cellules endothéliales d'aorte bovine (BAE) ou murine (MAE) est également souvent décrite. Cependant, ces cellules proviennent de larges vaisseaux, et présentent donc des caractéristiques phénotypiques différentes de celles des capillaires sanguins, principaux acteurs de l'angiogenèse.

Les sources les plus courantes de cellules endothéliales microvasculaires sont la peau, le cerveau, le tissu adipeux et la glande adrénale. Cependant, les cellules endothéliales microvasculaires issues de ces différents tissus ou organes diffèrent des cellules endothéliales issues de tumeurs. Ces dernières devraient préférentiellement être choisies pour le développement d'inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale<sup>(374)</sup>, mais les difficultés techniques

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

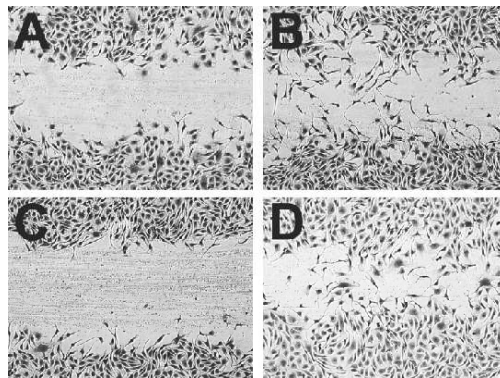
quant à leur isolation du tissu tumoral ont à ce jour sérieusement limité leur utilisation lors d'études précliniques.

En résumé, il existe donc non seulement des différences entre cellules endothéliales issues de larges vaisseaux et les cellules endothéliales d'origine microvasculaire, mais également des propriétés spécifiques des cellules endothéliales issues de différentes espèces, de différents sites d'organes, et même au sein de mêmes organes <sup>(375)</sup>, rendant le choix du type de cellules délicat.

Les conditions de culture sont également essentielles. Des milieux de culture très riches en facteurs de croissance, induisant une forte prolifération cellulaire, peuvent rendre les cellules endothéliales ainsi sur-stimulées, réfractaires aux stimuli angiogéniques et, de ce fait, inadaptées pour les tests. Les cellules endothéliales utilisées *in vitro*, dans un état prolifératif, sont différentes des cellules endothéliales trouvées normalement *in vivo*. En effet, ces dernières demeurent dans un état quiescent juste avant l'initiation du processus angiogénique. Idéalement, des conditions de culture semblables à celles retrouvées dans la tumeur devraient être utilisées.

### II.5.1.2 Les tests de migration des cellules endothéliales

Un premier test permettant d'estimer l'effet d'une molécule sur la migration des cellules endothéliales est le **test de cicatrization** (*wounding assay*). Une fine bande de cellules est enlevée d'une couche de cellules confluentes (*Figure 18*) et les cellules qui migrent dans cet espace sont dénombrées. La quantification reste cependant assez arbitraire et il peut être difficile d'obtenir des conditions reproductibles de confluence <sup>(376)</sup>.

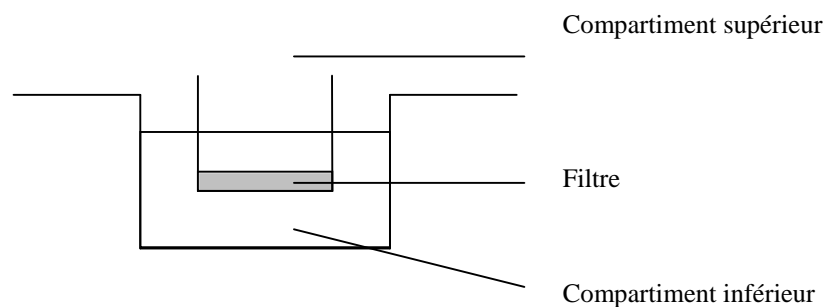


**Figure 18.** Evaluation du potentiel anti-angiogénique du cyclo-VEGI (voir tableau 6, page 43) par test de migration *wounding assay* de cellules BAE. *A*, Milieu sans sérum. *B*, Induction de la migration cellulaire par le VEGF<sub>165</sub>. *C*) Inhibition de la migration induite par le VEGF<sub>165</sub> en présence de cyclo-VEGI. *D*) Un peptide contrôle n'inhibe pas la migration cellulaire <sup>(288)</sup>.

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

Dans le test de migration en **chambre de Boyden**, deux compartiments sont séparés par un filtre en polycarbonate, au travers duquel des cellules peuvent migrer. Les molécules chimio-attractrices (stimulus chimiotactique) sont placées dans le compartiment inférieur, et les cellules endothéliales sont placées dans le compartiment supérieur (*Figure 19*). Si les molécules à tester agissent sur la molécule chimio-attractrice (*e.g.* anticorps neutralisants), elles sont placées dans le compartiment inférieur ; si elles agissent directement sur les cellules endothéliales ou les molécules qu'elles sécrètent (*e.g.* inhibiteurs de MMPs), elles sont placées dans le compartiment supérieur, avec les cellules endothéliales <sup>(377)</sup>. Les pores du filtre doivent être assez gros pour permettre aux cellules de migrer au travers, mais suffisamment petites pour ne permettre que le passage actif des cellules endothéliales activées ; différentes tailles de pores (5-12  $\mu\text{m}$ ) existent à cet effet <sup>(373)</sup>. Après une période d'incubation (4 à 6 heures à 37°C), les cellules du compartiment supérieur sont enlevées, et les cellules qui ont migré en direction du stimulus chimiotactique sont quantifiées après coloration, par simple comptage ou test MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) <sup>(377)</sup>.



**Figure 19. Test de migration en chambre de Boyden.**

Une variante de ce test est le test de **chimio-invasion en chambre de Boyden**. Dans ce test, du Matrigel® est utilisé pour créer une fine couche de membrane basale artificielle sur le filtre. Le Matrigel® est une membrane basale synthétique, dérivée de celle du sarcome Engelbreth-Holm-Swarm <sup>(373)</sup>. Il est constitué de diverses protéines, telles que la laminine, le collagène IV, l'héparane-sulfate, la fibrine, ainsi que de facteurs de croissance, comme l'EGF, le TGF $\beta$ , le PDGF et l'IGF-1. Utilisé à l'origine pour étudier l'invasion tumorale et identifier des molécules anti-métastatiques, ce test a été adapté pour l'étude de l'invasion des cellules endothéliales. Par rapport au test de Boyden classique, ce test de Boyden modifié permet d'étudier l'étape de dégradation de la membrane basale, en plus de celle de migration <sup>(377)</sup>.

### II.5.1.3 Les tests de prolifération des cellules endothéliales

Les tests de prolifération des cellules endothéliales sont faciles à réaliser, reproductibles et quantifiables <sup>(376)</sup>, mais ne permettent pas de distinguer une molécule simplement cytotoxique d'une molécule anti-angiogénique. Il convient donc d'effectuer, en parallèle, ces tests sur des cellules non-endothéliales, afin de vérifier que la molécule, à des concentrations similaires à celles utilisées pour les tests sur cellules endothéliales, n'affecte pas la prolifération des cellules non-endothéliales.

Les tests les plus simples consistent à compter les cellules viables avec un **hémocytomètre** et un colorant vital (*e.g.* bleu de trypan), ou un compteur électronique type **Coulter**. Il est également possible d'utiliser un **test de prolifération type MTT**, dans lequel un sel de tétrazolium (jaune) est clivé par les enzymes mitochondriales (succinate déshydrogénases) en cristaux de formazan (bleus). Par ailleurs, la synthèse d'ADN peut aussi être utilisée comme indice de prolifération, en évaluant, par exemple, l'**incorporation de thymidine tritiée**. D'autres méthodes permettent d'étudier la répartition dans le cycle cellulaire, en utilisant des molécules s'incorporant dans l'ADN, comme le 5-bromo-déoxyuridine (**BrdU**). Il est également possible d'utiliser des anticorps anti-**PCNA** (*proliferating cell nuclear antigen*, marqueur des cellules en phase G1/S) ou anti-**Ki67** (antigène nucléaire absent chez les cellules quiescentes) ; toutes ces approches se font par cytométrie de flux. Il peut être judicieux de combiner ces tests de prolifération avec des tests permettant d'estimer l'apoptose ou la nécrose, comme le test **TUNEL** (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*), le marquage à l'**iodure de propidium**, ou en analysant l'expression de marqueurs d'apoptose tels que les **caspases** ou l'**annexine V** <sup>(373)</sup>.

### II.5.1.4 Les tests de différenciation (formation de tubes capillaires)

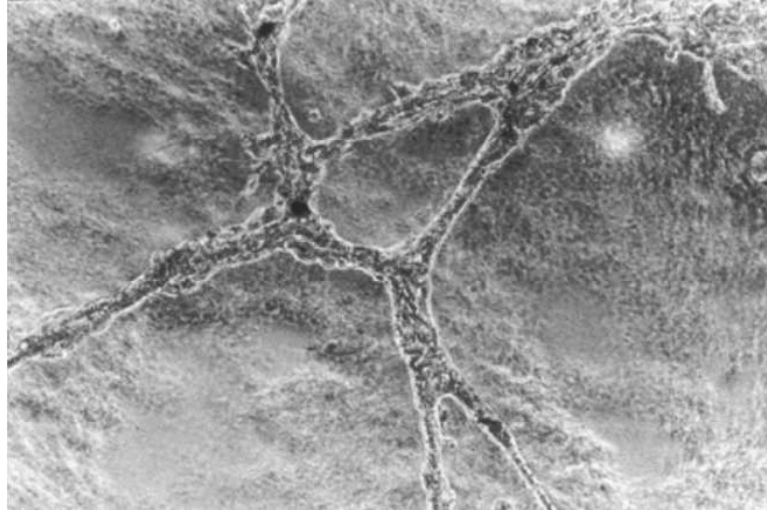
La différenciation des cellules endothéliales pour former des vaisseaux peut être induite *in vitro* en cultivant les cellules endothéliales en présence de différents composants de la MEC, par exemple des **gels bi- ou tri-dimensionnels** de collagène I ou de fibrine, ou du Matrigel®. Les cellules endothéliales cultivées sur Matrigel® peuvent former des structures capillaires (*Figure 20*) en à peine 6 heures, ce qui rend ce test adapté au *screening* de molécules anti-angiogéniques <sup>(377)</sup>. Les structures tubulaires sont viables pendant environ 48



## Partie II : Synthèse bibliographique

---

heures, puis, en l'absence de facteurs de croissance pro-angiogéniques, les cellules endothéliales meurent. La réponse est quantifiée par des techniques d'analyses d'images, permettant notamment de mesurer le nombre et la longueur des tubes ou l'aire couverte par le réseau de capillaires <sup>(373)</sup>.



**Figure 20. Formation de tubes sur Matrigel® <sup>(24)</sup>.**

Il est également possible de réaliser une **co-culture** de cellules endothéliales avec des cellules stromales (fibroblastes ou CML), en présence ou en l'absence d'une MEC <sup>(376)</sup>. Ce type de test reproduit plus fidèlement la situation *in vivo* que le test Matrigel® simple, mais il est beaucoup plus long (12 à 14 jours) et les composants de la matrice sécrétés par les cellules stromales ne sont pas connus *a priori*.

### II.5.1.5 L'anneau aortique

L'angiogenèse n'implique pas uniquement les cellules endothéliales, ce qui a conduit à l'utilisation de tests plus sophistiqués que ceux décrits précédemment, sur organes *ex vivo*, tels que le test de l'anneau aortique. Dans ce test, une aorte de rat est isolée et coupée en segments qui sont placés en culture, dans une matrice (collagène I, fibrine ou Matrigel®), en présence du stimulus angiogénique et des molécules, potentiellement anti-angiogéniques, à tester. Lors des 7 à 14 jours suivants, la croissance de vaisseaux sanguins autour du segment aortique est observée. La quantification se fait en mesurant le nombre et la longueur de ces vaisseaux, par analyse d'image en microscopie <sup>(373, 378)</sup>. Contrairement à la plupart des autres

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

modèles *in vitro*, celui-ci implique également des cellules non-endothéliales (e.g. CML, péricytes et fibroblastes).

Cependant, comme l'angiogenèse est un processus essentiellement microvasculaire, l'utilisation de macrovaisseaux tels que l'aorte n'est pas idéale <sup>(24, 376)</sup>.

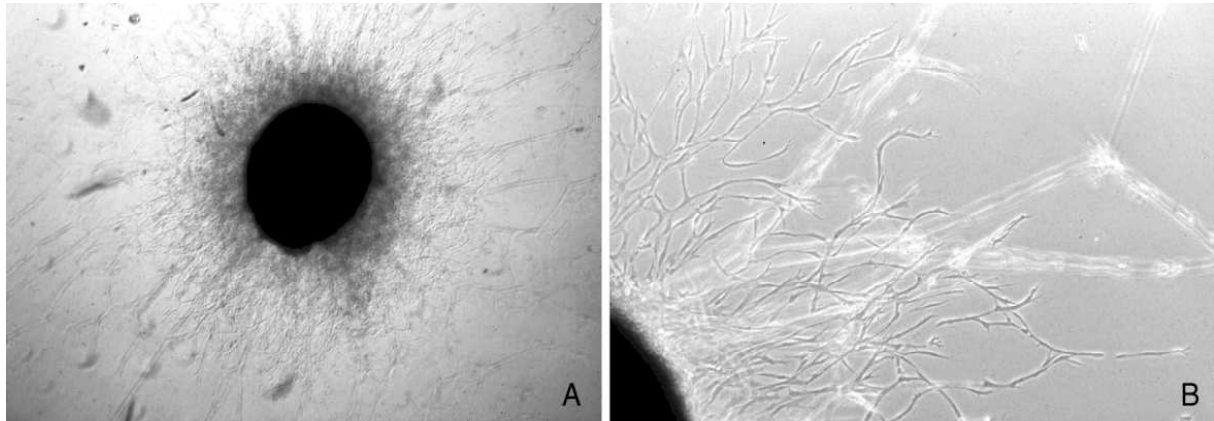


Figure 21. Croissance de vaisseaux à partir d'une aorte. A. Vue d'ensemble. B. Vue de détail montrant la formation de tubes par les cellules endothéliales <sup>(24)</sup>.

L'avantage des tests *in vitro*, outre leur faible coût, est qu'ils permettent d'étudier séparément les différentes étapes de l'angiogenèse. Si les tests *in vitro* sont indispensables pour le *screening* rapide de molécules, l'activité anti-angiogénique d'une molécule doit obligatoirement être confirmée par des tests *in vivo*, plus complexes <sup>(24)</sup>. Le test *in vivo* idéal devrait permettre de suivre la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux dans un environnement naturel, et de se prêter à une analyse rapide, aisée, et si possible quantitative et en temps réel <sup>(373)</sup>. Les principaux modèles d'angiogenèse *in vivo* sont présentés ci-après.

### II.5.2 Les modèles *in vivo*

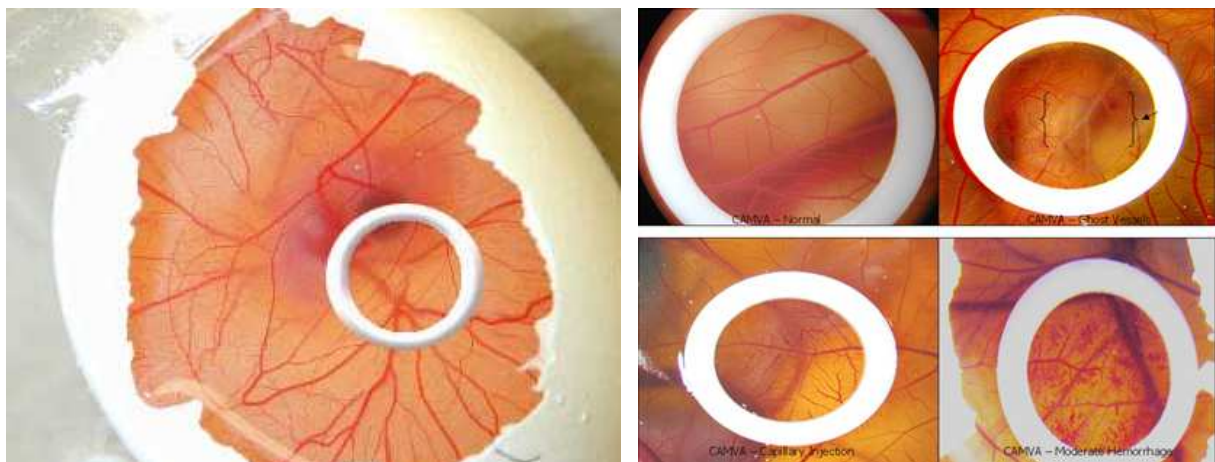
#### II.5.2.1 La membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet

Utilisé à l'origine par les embryologistes, le test CAM (*chorioallantoic membrane*) a été utilisé par la suite pour le *screening* de molécules anti-angiogéniques, du fait de sa simplicité et de son faible coût. Il a permis l'identification de la plupart des facteurs angiogéniques connus à ce jour <sup>(379)</sup>. L'allantois est une membrane extra-embryonnaire dérivée du mésoderme, dans laquelle les vaisseaux sanguins commencent à se former à partir de E3 ; la CAM est ensuite formée à partir de la fusion entre l'allantois et le chorion (E4).

## Partie II : Synthèse bibliographique

Dans ce test, des œufs fertilisés sont incubés à 37°C pendant 72 heures. Une fenêtre rectangulaire est alors découpée dans la coquille afin d'exposer les vaisseaux de la CAM. Le stimulus pro-angiogénique (molécule pro-angiogénique ou fragment tumoral) est ajouté (E8), en présence ou en l'absence des molécules anti-angiogéniques à tester. La réponse angiogénique est quantifiée 3 à 4 jours plus tard. Une augmentation du nombre de vaisseaux, ainsi qu'une disposition radiale de ceux-ci en direction du stimulus pro-angiogénique, sont considérées comme des preuves de néo-angiogenèse ; au contraire, en présence de molécules anti-angiogéniques, les vaisseaux deviennent moins denses (*Figure 22*)<sup>(379, 380)</sup>. Dans une variante de ce test, l'embryon est transféré dans des boîtes de Pétri (E3 ou E4), afin de permettre une meilleure visualisation du réseau vasculaire<sup>(24, 379)</sup>.

Le principal inconvénient de ce test est qu'il est difficile de distinguer les vaisseaux préexistants des nouveaux capillaires formés par angiogenèse.



**Figure 22.** Test CAM. *A gauche* : vue d'ensemble du test *in ovo*. *A droite* : les dommages vasculaires (*e.g.* absence de vaisseaux, hémorragie) de la CAM d'œufs fertilisés sont visualisés après exposition topique d'une molécule à tester.

### II.5.2.2 L'angiogenèse cornéenne

La cornée est normalement avasculaire, donc tout vaisseau apparaissant dans la cornée après stimulation correspond à des vaisseaux nouvellement formés, ce qui fait de ce test un modèle idéal d'angiogenèse *in vivo*. Brièvement, une poche est formée dans la cornée de lapins, de rats ou de souris, dans laquelle est introduit le stimulus angiogénique (*e.g.* fragment tumoral). De nouveaux vaisseaux sont formés à partir des vaisseaux limbiques périphériques. Les molécules anti-angiogéniques peuvent être administrées par voie orale ou systémique, par injection en *bolus* ou, mieux, en implantant des polymères ou des pompes osmotiques, qui

vont progressivement libérer la substance. L'observation de la réponse vasculaire peut se faire directement pendant toute la durée de l'expérience, avec ou sans l'utilisation d'agents de contraste, tels que le dextran de haut poids moléculaire marqué avec un fluorochrome tel que la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Dans le domaine de la PDT, ce type de test a été principalement utilisé pour des applications de traitement de la DMLA, notamment avec la Visudyne®<sup>(381)</sup>.

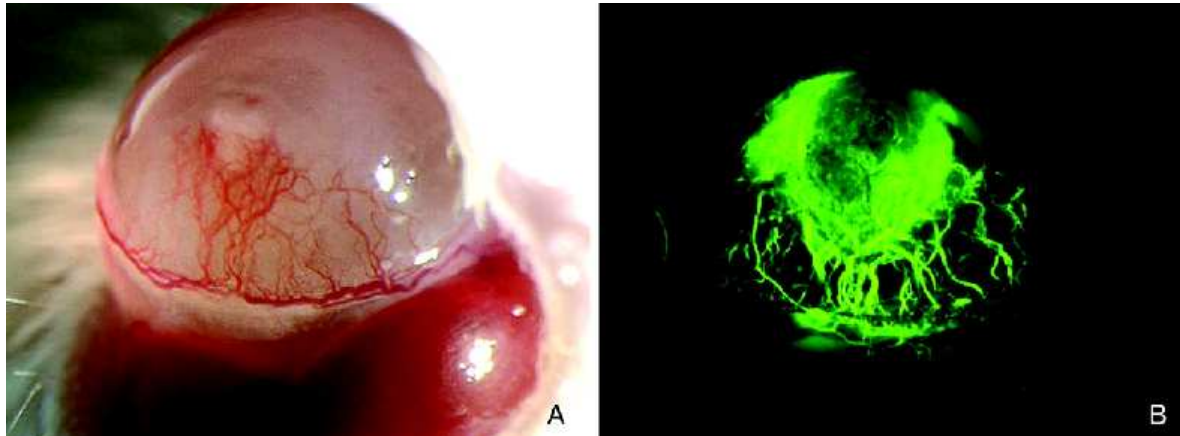


Figure 23. Angiogenèse induite dans la cornée de souris par le FGFb par microscopie de transmission (A) ou de fluorescence, après injection de FITC-dextran (B)<sup>(24)</sup>.

### II.5.2.3 Le modèle du sac à air dorsal

Ce modèle a initialement été développé afin de remplacer le test d'angiogenèse cornéenne, douloureux pour l'animal. Dans ce modèle, un sac à air est formé 8 à 14 jours après injection de 10 à 15 mL d'air en sous-cutané au niveau du dos d'une souris. Le sac à air apparaît comme une membrane avasculaire presque transparente dans laquelle l'induction de nouveaux vaisseaux peut être étudiée. La souris est alors anesthésiée et le stimulus angiogénique (cellules tumorales ou facteurs pro-angiogéniques, placés éventuellement dans une matrice polymère) est placé au-dessus de la membrane, juste en dessous de la peau. Après traitement systémique avec la molécule à tester, la formation de nouveaux vaisseaux est observée 8 à 10 jours après l'induction de l'angiogenèse<sup>(376)</sup>.

### II.5.2.4 Les chambres transparentes et la microscopie intravitale

L'étude *in vivo* de l'angiogenèse a été grandement facilitée par le développement de plusieurs types de chambres transparentes, implantées dans l'oreille, la peau du dos (*Figure*

## Partie II : Synthèse bibliographique

24) ou le crâne (*Figure 25*), de lapins, souris, rats ou hamsters. Dans le modèle du *dorsal skinfold*, la peau du dos de l'animal est maintenue à l'aide d'un système en titane (*Figure 24*), et le stimulus angiogénique est injecté <sup>(380)</sup>. Ce modèle permet la mesure en continu et de façon non invasive de divers paramètres chez l'animal vivant, notamment l'angiogenèse et le flux sanguin, par microscopie de fluorescence mono- ou multi-photonique <sup>(376)</sup>, cette dernière permettant d'obtenir un meilleur contraste et de visualiser des régions plus profondes de l'organisme <sup>(382)</sup>. Ces chambres ne peuvent être utilisées au-delà de quatre à six semaines, du fait de l'apparition d'une nécrose et d'une perte d'élasticité cutanées <sup>(380)</sup>. D'autres modèles utilisant des chambres semi-transparentes ont également été décrits, tels que le modèle du *hamster cheek pouch* ou celui du mésentère de rat <sup>(383)</sup>.

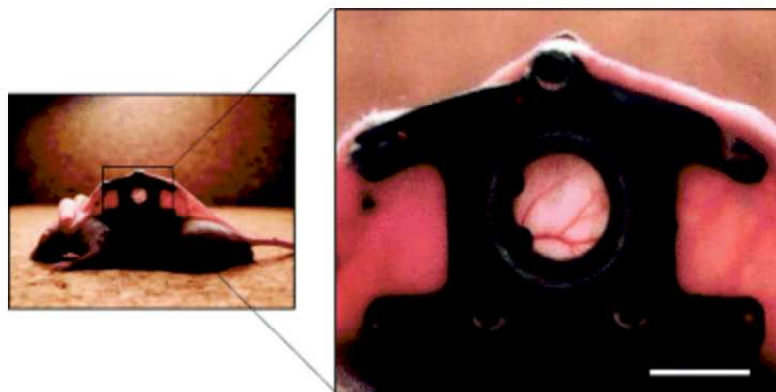


Figure 24. Chambre transparente implantée au niveau du dos d'une souris <sup>(376)</sup>.



Figure 25. Chambre transparente implantée au niveau du crâne d'une souris. (A) Vue d'ensemble. (B) Reconstruction d'images (4x) prises au niveau de la chambre, une semaine après chirurgie. (C) Grossissement (10x) d'une région d'intérêt de B.

### II.5.2.5 Les implants sous-cutanés

Des cellules tumorales sont introduites dans une matrice polymère, qui est ensuite implantée en sous-cutané chez l'animal. Les cellules tumorales ne sont pas en contact direct avec l'environnement de l'hôte, mais les facteurs pro-angiogéniques qu'elles produisent peuvent diffuser en dehors de la matrice. Après injection des composés à tester, les vaisseaux

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

sanguins formés peuvent être quantifiés dès 3 jours après induction de l'angiogenèse, en mesurant le taux d'hémoglobine, par analyse histologique ou en estimant le flux sanguin à l'aide de traceurs radioactifs ou fluorescents <sup>(24, 373)</sup>.

Dans une variante de ce test, du Matrigel® contenant les cellules tumorales est injecté en sous-cutané, où il se solidifie pour former un «bouchon» (*plug*). En effet, le Matrigel® est liquide à 4°C mais forme un gel solide à 37°C <sup>(377)</sup>. Les molécules à tester sont alors administrées et, au bout de 7 à 21 jours, le bouchon est retiré, et la formation de vaisseaux sanguins est estimée comme précédemment. Ce test est rapide et d'accès relativement aisé, mais une analyse en temps réel est impossible, et l'environnement où se développent les vaisseaux n'est pas représentatif de l'environnement tumoral <sup>(373)</sup>, ce qui a conduit à l'utilisation de modèles tumoraux.

### II.5.2.6 Les modèles tumoraux

On parle de modèles tumoraux syngéniques lorsque la tumeur provient de la même espèce que l'hôte de la greffe, et de xénogreffes dans le cas contraire (c'est le cas notamment lorsque des tumeurs humaines sont implantées chez des souris immunodéficientes telles que la souris *nude*). Les souris *nude* ont été découvertes en 1962 dans un élevage de souris albinos non consanguines. Ces souris sont caractérisées par une absence de thymus, qui les rend immunodéficientes en lymphocytes T matures, ce qui permet d'éviter le rejet de xénogreffes.

Les tumeurs peuvent être implantées en orthotopique (dans le tissu d'origine) ou en ectopique/hétérotopique (dans un environnement tissulaire différent du tissu d'origine, *e.g.* en sous-cutané). Les xénogreffes ectopiques permettent une mesure aisée de la croissance tumorale. Cependant, les cellules tumorales évoluant dans un environnement différent de leur environnement d'origine perdent certaines de leurs caractéristiques (*e.g.* pouvoir invasif locorégional et métastatique <sup>(384)</sup>) ; de plus, l'angiogenèse diffère entre modèles ectopiques et orthotopiques <sup>(385)</sup>.

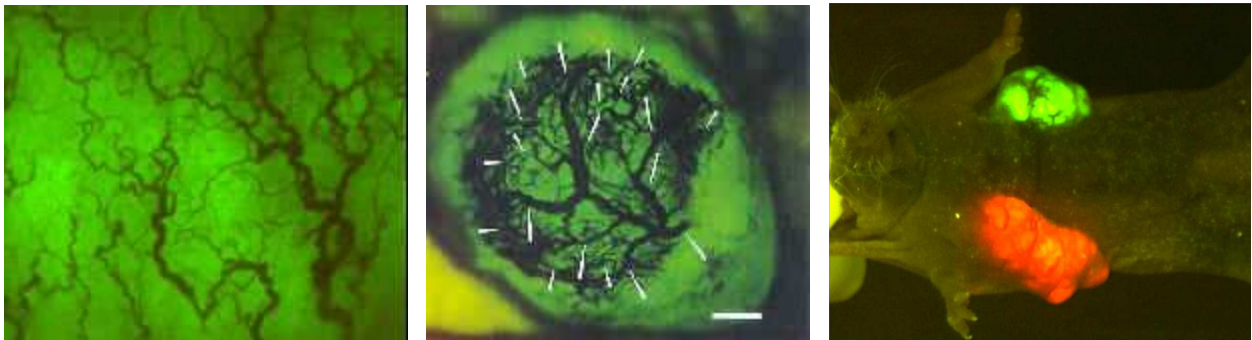
L'effet de la molécule à tester est estimé en suivant l'évolution de la prise de greffe, le temps de latence, l'évolution de la taille tumorale (diamètre, aire ou volume), l'apparition de métastases et/ou la survie de l'animal, à intervalles réguliers <sup>(373, 376)</sup>. D'autres analyses (*e.g.* histologie) peuvent être utilisées *ex vivo* pour examiner de façon plus précise les effets sur les



## Partie II : Synthèse bibliographique

vaisseaux sanguins. L'avantage des modèles tumoraux, par rapport au test CAM, par exemple, est qu'ils permettent d'étudier la pharmacocinétique du candidat médicament, en plus de son efficacité <sup>(376)</sup>. Leur inconvénient principal est que la visualisation de l'angiogenèse nécessite en principe le sacrifice de l'animal, ce qui rend impossibles des analyses non invasives en temps réel, *a fortiori* dans le cas de greffes orthotopiques, d'accès difficile.

Une approche relativement nouvelle permettrait de pallier cet inconvénient. Il s'agit du modèle **Angiomouse**®, développé par la société AntiCancer Incorporated (San Diego, Etats-Unis). Il s'agit d'une technique permettant d'étudier l'angiogenèse tumorale *in vivo* <sup>(386)</sup>, en utilisant la GFP (*Green Fluorescent Protein*), protéine isolée de la méduse *Aequorea victoria*. La GFP est utilisée pour transférer des cellules tumorales, qui sont ensuite implantées en orthotopique chez l'animal. L'expression de la GFP dans les tumeurs primaires et dans leurs métastases est détectée par fluorescence. Les nouveaux vaisseaux, formés par angiogenèse, sont non fluorescents (car issus de l'hôte), et apparaissent donc noirs, en fort contraste avec la fluorescence verte des cellules tumorales greffées. Ce modèle permet de visualiser les néovaisseaux tumoraux en temps réel, de manière non invasive, sur l'animal vivant, par microscopie intravitale ou au travers de la peau (*Figure 26*).



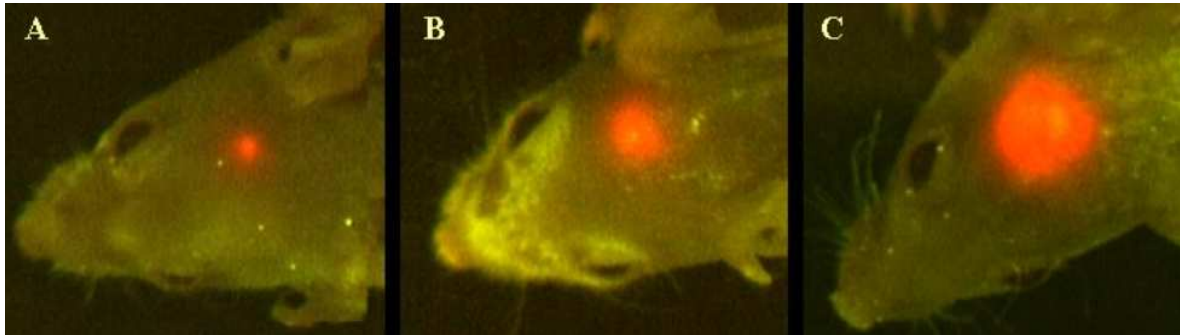
**Figure 26. Modèle Angiomouse®.** *A gauche* : imagerie des vaisseaux (noir) chez des souris *nude* porteuses de cancer de la prostate humaine PC3-GFP. *Au milieu* : imagerie intravitale dans une tumeur de poumon humaine ANIP973-GFP chez la souris *nude*. *A droite* : Modèles orthotopiques de tumeurs du sein : MDA-MB435-GFP et MDA-MB-435-RFP <sup>(387)</sup>.

Plus de 60 modèles tumoraux ont à ce jour été développés. La RFP (*Red Fluorescent Protein*) a également été utilisée pour transférer les cellules, dans le but d'assurer une meilleure pénétration de la lumière (*Figure 27*), mais n'est pas indiquée dans le cas d'une utilisation avec des PS qui fluorescent dans le rouge. Un des inconvénients de la GFP est que

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

la sensibilité de détection est limitée du fait de l'absorption de lumière par les tissus environnants, en particulier la peau, ce qui peut être amélioré en réalisant une petite fenêtre dans la peau (*skin flap*), qui peut être alternativement ouverte et refermée. D'autre part, il a été montré que l'expression de la GFP peut être diminuée dans de faibles conditions d'oxygénation <sup>(388)</sup>, conditions qui surviennent dans de nombreuses tumeurs expérimentales ou cliniques, ce qui soulève des interrogations quant à l'utilisation de ce type de modèle tumoral.



**Figure 27.** Gliomes humains U87-RFP implantés en orthotopique dans le cerveau de souris *nude* (1, 3 et 5 semaines).

L'imagerie par bioluminescence constitue une autre méthode non invasive, utilisant la luciférase, enzyme isolée du ver luisant *Photinus pyralis*, qui est transfectée dans les cellules tumorales <sup>(389-391)</sup>. Quelques minutes après administration du substrat, la luciférine, se produit une réaction d'oxydation de la luciférine, en présence d'ATP. La formation d'oxyluciférine qui en résulte est accompagnée d'une émission de photons, dans les cellules tumorales exprimant la luciférase, ce qui permet de réaliser un suivi de la croissance tumorale et de l'apparition de métastases.



**Tableau 8. Avantages et inconvénients des principaux tests *in vivo* utilisés pour l'évaluation d'agents anti-angiogéniques (adapté d'après <sup>(373)</sup>).**

Test	Simplicité	Reproductibilité	Quantitatif	Evaluation en temps réel	Bon marché	Adapté au criblage	Site naturel d'angiogenèse	Site avasculaire	Matériel facilement accessible	Représentatif de l'angiogenèse tumorale	Utilisé en PDT
CAM	++	++	+	+	++	++	+	-	-	-	+++
Cornée	-	±	+	+++	-	-	-	+++	++	-	+++
Chambres transparentes	-	++	++	+++	+	-	±	±	++	+++	++
Modèles tumoraux	++	++	++	-	++	-	++	-	++	±	+++
Implants sous-cutanés	+++	+	++	-	++	++	-	+++	++	+	+
AngioMouse®	-	++	++	++	-	-	+++	-	-	+++	+

### II.5.2.7 Les méthodes d'estimation des effets anti-angiogéniques et anti-vasculaires

Puisque les thérapies anti-angiogéniques et anti-vasculaires sont conçues pour agir sur les vaisseaux sanguins des tumeurs, des changements de morphologie des vaisseaux (nombre, espacement et taille des vaisseaux), de perméabilité vasculaire, de flux sanguin et d'oxygénation peuvent constituer des paramètres d'intérêt pour l'évaluation de l'efficacité de ces thérapies <sup>(392)</sup>. Si les modèles utilisant une chambre intravitale peuvent permettre une analyse relativement aisée de la plupart des différents paramètres *in situ* <sup>(34)</sup>, ce n'est par exemple pas le cas des modèles tumoraux classiques.

#### II.5.2.7.1 Visualisation des vaisseaux sanguins

La plupart des études microscopiques de l'angiogenèse utilisent des coupes histologiques. Dans ce cas, la détection des vaisseaux est réalisée par **marquage immunohistochimique** de marqueurs de cellules endothéliales (*e.g.* CD31, CD34, facteur de von Willebrand). Il est également possible de marquer les lames basales des vaisseaux avec des anticorps anti-collagène IV. L'apparence des vaisseaux sanguins sur coupes histologiques est fortement influencée par l'épaisseur des coupes <sup>(34)</sup>. Une approche traditionnelle de quantification est la mesure de la densité microvasculaire, c'est-à-dire le nombre de vaisseaux par unité de surface, mais il n'existe pas de consensus sur la méthodologie précise à employer pour cette mesure <sup>(23)</sup>. Des techniques de coloration permettent d'analyser la structure des vaisseaux, leur dimension et leur degré de dilatation, une éventuelle thrombose, ainsi que l'apoptose/nécrose concomitante des cellules tumorales <sup>(373)</sup>. Cependant, cette méthode ne permet pas de distinguer les vaisseaux fonctionnels (permettant un flux sanguin) des vaisseaux non-fonctionnels.

Par ailleurs, elle nécessite le prélèvement du tissu d'intérêt et ne peut donc pas être réalisée pour un suivi en temps réel. Certaines méthodes d'imagerie, non invasives, peuvent permettre une visualisation *in situ* des vaisseaux sanguins. Elles incluent l'imagerie par résonance magnétique (**IRM**), la tomographie par émission de positons (**TEP**), le scanner ou tomographie axiale calculée (**CT-scan**), utilisant les rayons X, et **l'échographie**, à bases d'ultrasons. Certaines de ces techniques, couramment utilisées en clinique humaine, sont développées chez le petit animal avec pour objectif d'en améliorer la résolution <sup>(373)</sup>.

Néanmoins, l'ensemble de ces techniques ne permettent pas de différencier les néovaisseaux, issus d'un processus angiogénique, des vaisseaux préexistants quiescents. Cela a conduit à la recherche de marqueurs moléculaires du processus angiogénique (*e.g.* intégrines  $\alpha_v$ , récepteurs au VEGF), pour le développement d'anticorps en immunohistochimie ou de traceurs pour les différentes techniques d'imagerie<sup>(23, 373)</sup>.

### II.5.2.7.2 Mesure de la perfusion tumorale

Les dommages vasculaires induits par la PDT altèrent le flux sanguin au niveau du site traité. La méthode la plus simple consiste à administrer par voie i.v. un **traceur** purement vasculaire (pouvant marquer les cellules endothéliales mais ne diffusant pas dans les tissus), comme une lectine fluorescente (*Lycopersicon esculentum* marquée FITC) ou du Hoechst 33342<sup>(34, 341)</sup>. Des marqueurs radioactifs peuvent également être utilisés<sup>(341)</sup>. Ensuite, une technique histologique permettra de visualiser les vaisseaux fonctionnels, et non les bourgeons endothéliaux ne possédant pas de lumière. Néanmoins, cette méthode ne permet pas de quantifier précisément le flux sanguin.

**L'IRM** avec un produit de contraste (*e.g.* dérivé du gadolinium) permet de distinguer les zones d'hyperperfusion (qui se traduisent sur l'image par une zone de signal faible) des zones d'hypoperfusion (qui apparaissent très intenses). Les techniques par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont notamment été utilisées pour visualiser les changements vasculaires après PDT au niveau du cerveau<sup>(393, 394-396)</sup>, mais également au niveau de la vessie<sup>(397)</sup> ou de la prostate, avec le Tookad<sup>(398)</sup>.

**L'effet Doppler** est le décalage entre la fréquence d'une onde émise et celle de l'onde reçue, lorsque l'émetteur et le récepteur sont en mouvement l'un par rapport à l'autre<sup>(399)</sup>. Par cet effet, on peut mesurer un débit sanguin, suite à l'interaction d'une onde (mécanique, comme le son, ou électromagnétique, comme la lumière) avec les cellules sanguines (principalement les globules rouges, les cellules sanguines les plus nombreuses), en mouvement dans le sang. Le changement de fréquence observé est relié au produit de la vitesse de ces cellules et de leur nombre.

**L'échographie Doppler** (ou ultrasonographie) utilise des ultrasons<sup>(373)</sup> et éventuellement des agents de contraste (microbulles), permettant d'améliorer la sensibilité de

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

cette technique <sup>(34)</sup>. Néanmoins, cette technique ne permet que des analyses en superficie et présente une faible résolution.

Dans la technique du **Laser Doppler**, ce sont les changements de fréquence d'une onde laser (dans le proche infrarouge, pouvant pénétrer relativement profondément dans les tissus) qui sont mesurés. Plusieurs systèmes sont commercialisés par différents fabricants (Moor Instrument, Oxford Optronix et Perimed), dont le système OxyFlo® d'Oxford Optronix (Oxford, Royaume-Uni), qui a été utilisé dans notre étude. Cette technique a été largement utilisée afin d'évaluer les modifications de perfusion liées à la PDT <sup>(400-406)</sup>. Elle peut être non invasive, mais elle ne permet alors que des mesures en superficie du tissu (< 500 µm) <sup>(407)</sup>, et il est donc généralement nécessaire d'insérer des sondes dans la tumeur. Une technique voisine du Laser Doppler est la spectroscopie de corrélation diffuse, également utilisée dans le domaine de la PDT <sup>(407-409)</sup>. Cette méthode est non invasive (la sonde n'est même pas en contact avec le tissu) et permet des mesures plus profondes dans les tissus <sup>(407)</sup>.

D'autres équipes ont utilisé des systèmes basés sur la **granularité Laser** (*Laser speckle*) <sup>(410, 411)</sup>, qui représente en fait une analyse différente du même phénomène que celui du Laser Doppler <sup>(412)</sup>. Le *speckle* est une interférence optique qui peut être observée lorsque des objets sont illuminés par une lumière laser. Cet effet est d'aspect granulaire, présentant des «taches» claires et sombres, causées, respectivement, par les interférences constructives et destructives de la lumière laser diffusée. Si la zone illuminée contient des diffuseurs mobiles individuels, tels que des cellules sanguines, l'effet *speckle* granulaire fluctue. En analysant ces fluctuations, il est possible d'obtenir une information sur la distribution de vitesse de ces diffuseurs : ainsi, une méthode non invasive pour évaluer le flux sanguin peut être développée. Les mesures sont limitées à la surface du tissu mais cette technique permet d'obtenir de très bonnes résolutions spatiales.

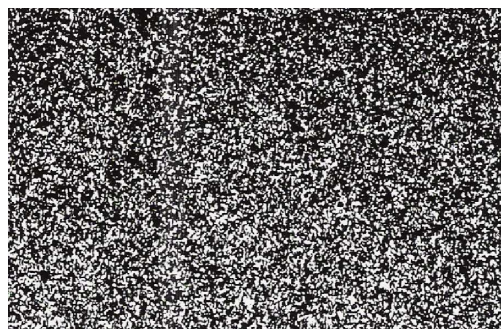


Figure 28. Illustration du phénomène de *Laser speckle* ou granularité Laser <sup>(412)</sup>.

### II.5.2.7.3 Mesure de l'oxygénation

L'oxygénation tissulaire peut être un témoin de la fonctionnalité des vaisseaux. Elle peut être estimée de plusieurs façons :

- **Sondes polarographiques**, type  $pO_2$  *Histogram* d'Eppendorf® (Hambourg, Allemagne).

La  $pO_2$  est déterminée par réduction électrochimique de l'oxygène dissous, à l'aide d'une sonde introduite dans le tissu tumoral, guidée par un moteur qui lui permet de pénétrer « pas à pas » dans les tissus, et de prendre plusieurs mesures successives de la  $pO_2$  sur un même axe.

L'électrode consomme elle-même de l'oxygène, ce qui peut conduire à sous-estimer la concentration d'oxygène tissulaire, et ce, de façon non négligeable pour des tissus hypoxiques. Il n'est pas possible de réaliser des mesures répétées au même endroit, du fait du mouvement de la sonde, rendu obligatoire afin de minimiser l'impact de la consommation d'oxygène<sup>(413)</sup>. Elle est par ailleurs peu sensible aux basses  $pO_2$  (<10 mmHg) couramment trouvées dans les tumeurs, du fait que la  $pO_2$  est directement proportionnelle au courant généré à la cathode<sup>(414)</sup>. De plus, ces sondes requièrent une calibration avant chaque expérience, dans une solution de sérum physiologique, saturée successivement en oxygène puis en azote, afin de définir respectivement le 100% puis le 0% d'oxygène ; les mesures sont corrigées par rapport à la température et à la pression atmosphérique du jour. Ces sondes ont déjà été utilisées pour le suivi de la  $pO_2$  durant PDT<sup>(415)</sup>.

- **Quenching de fluorescence.**

Dans le système OxyLite® *E-series* (Oxford Optronix), une lumière excitatrice, de longueur d'onde fixée à 505 nm, est transmise le long d'une fibre optique pour exciter un fluorophore dérivé du platine incorporé dans une matrice en silicone située au bout de la sonde. La fluorescence ainsi générée (650 nm) est renvoyée à un détecteur par l'intermédiaire de la fibre. La fluorescence est *quenchée* par les molécules d'oxygène et le temps de vie de fluorescence est donc inversement proportionnel à la concentration d'oxygène dissous. Ce signal de fluorescence est converti en valeur absolue de  $pO_2$  en mmHg.

Contrairement au système polarographique, celui-ci est plus sensible aux basses  $pO_2$  (0-15 mmHg), et ne consomme pas d'oxygène, ce qui permet de réaliser des mesures en continu en un même point ; en contrepartie, l'appréciation de la  $pO_2$  moyenne sur l'ensemble de la tumeur nécessite plus de dextérité de la part du manipulateur, puisque le système ne fonctionne pas avec un moteur « pas à pas ». De plus, comme les mesures sont basées sur le temps de vie plutôt que l'intensité de fluorescence, les valeurs sont peu sensibles à des artefacts tels qu'une variation d'intensité de la source lumineuse, la lumière ambiante ou le photoblanchiment. Les calibrations sont stables<sup>(413)</sup> ; les sondes sont vendues précalibrées et les données de calibration sont fournies à l'utilisateur par un système de code-barres. Les valeurs de  $pO_2$  sont corrigées pour les variations de température (qui influent sur les temps de vie), à l'aide de thermocouples intégrés dans la sonde.

Le système OxyLite® peut être combiné avec le système OxyFlo® pour des mesures simultanées de  $pO_2$ , température et perfusion. Cependant, si la longueur d'onde de la lumière d'excitation de la PDT se situe aux alentours de 650 nm (longueur d'onde maximale de fluorescence du dérivé de platine), les mesures de  $pO_2$  ne peuvent être effectuées durant la PDT. Précédemment (jusqu'en 2003), le système utilisait des dérivés de ruthénium ( $\lambda_{exc} = 460$  nm ;  $\lambda_{ém} = 600$  nm), mais l'utilisation de dérivés du platine a permis d'améliorer la qualité du signal et la stabilité de la calibration. Le système OxyLite® a déjà été utilisé dans le domaine de la PDT<sup>(416, 417)</sup>.

Ces deux systèmes (*pO<sub>2</sub> Histogram* d'Eppendorf® et OxyLite®) permettent une mesure absolue de la  $pO_2$ , mais, du fait de leur caractère invasif, peuvent induire des perturbations du micro-environnement tumoral, provoquer des saignements et sont difficilement utilisables pour des tumeurs profondes, non accessibles.

- **Spectroscopie proche infrarouge.**

La spectroscopie proche infrarouge utilise de la lumière située dans le proche infrarouge (700-1000 nm), qui pénètre le tissu profondément. Cette technique permet un suivi de l'oxygénation intratumorale, en temps réel et de manière non invasive<sup>(413)</sup>. Dans le proche infrarouge, l'oxyhémoglobine et la déoxyhémoglobine présentent des spectres d'absorption caractéristiques et très différents. Le degré d'oxygénation peut être estimé à partir de la

## Partie II : Synthèse bibliographique

---

concentration d'oxyhémoglobine et d'hémoglobine totale (déoxyhémoglobine + oxyhémoglobine). Cette méthode ne permet pas, en revanche, d'obtenir de mesure absolue de la  $pO_2$ .

- **Sondes exogènes de l'hypoxie.**

Les dérivés du 2-nitroimidazole, tels le pimonidazole, l'EF3 et l'EF5 (E pour étanidazole et F indiquant le nombre d'atomes de fluor), injectés par voie i.v., forment des adduits avec les macromolécules (essentiellement des protéines) présentes dans les cellules hypoxiques viables ( $pO_2 < 10$  mmHg), et ce, de façon proportionnelle au degré d'hypoxie <sup>(418)</sup>.

La détection de ces adduits peut se faire par plusieurs méthodes <sup>(419)</sup>, mais la plus couramment utilisée reste l'immunohistochimie, qui utilise des anticorps monoclonaux, couplés à un fluorochrome (dont les caractéristiques spectrales doivent être bien distinctes de celles du PS), spécifiques de la sonde d'hypoxie utilisée, qui se fixeront sur les adduits formés. Cette méthode de révélation présente l'avantage de fournir des informations concernant la répartition spatiale des zones hypoxiques dans les tumeurs, mais ne permet pas de suivre l'évolution de l'oxygénation tumorale de manière continue ou répétée dans une même tumeur.

Si un tel marquage des zone hypoxiques a été déjà utilisé en PDT <sup>(420, 421)</sup>, il convient de noter que la PDT peut induire des dommages vasculaires. Par conséquent, il importe de choisir scrupuleusement le moment d'injection de la sonde, et éventuellement, des témoins d'expériences appropriés, afin de discriminer entre une absence de marquage due à l'absence d'adduits (preuve d'une bonne oxygénation) et une absence de marquage due aux dommages vasculaires, qui pourraient empêcher la délivrance des sondes au niveau tumoral.

- **Imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM)** <sup>(413, 422)</sup>.

La méthode la plus utilisée actuellement est celle basée sur l'aimantation de l'hémoglobine. Alors que l'oxyhémoglobine n'est pas active en RMN, la déoxyhémoglobine est active, car fortement paramagnétique, et agit comme agent de contraste endogène de l'oxygénation sanguine. Il s'agit de l'effet BOLD (*Blood Oxygen Level Dependent*) <sup>(413)</sup>.

- **Résonance paramagnétique électronique (RPE).**

Il s'agit d'une méthode de résonance magnétique qui détecte uniquement les espèces présentant des électrons célibataires. Malgré le caractère paramagnétique de l'oxygène, celui-ci ne peut être directement détecté par RPE <sup>(413)</sup>. L'oxymétrie par RPE repose donc sur une méthode indirecte : un radical «espion» (*e.g.* nitroxydes, radicaux triarylméthyl, lithium phtalo/naphtalo-cyanines) est introduit dans le milieu et l'oxygène présent agit de manière inversement proportionnelle à sa concentration sur le temps de relaxation du radical <sup>(423)</sup>. Cette technique offre une réponse linéaire sur toute la gamme pathologique de pO<sub>2</sub> et permet d'obtenir une réponse rapide et reproductible. Le champ radiofréquence utilisé peut pénétrer dans les tissus jusqu'à 10 mm (profondeur inversement proportionnelle à la fréquence utilisée) <sup>(424)</sup>. Cette technique a montré son intérêt dans le domaine de la PDT <sup>(405, 425)</sup>.

- **Marqueurs endogènes de l'hypoxie**

La compréhension des mécanismes moléculaires régulés par l'hypoxie a conduit à l'identification de protéines dont la présence et/ou la quantité sont le reflet de l'état d'oxygénation des tumeurs, et qui pourraient donc être utilisées comme marqueurs endogènes de l'hypoxie, comme HIF-1 $\alpha$ , le transporteur de glucose GLUT-1 ou le VEGF <sup>(419)</sup>.



### III OBJECTIFS

Ce travail de thèse avait pour but de développer un nouveau PS ciblant spécifiquement les cellules endothéliales angiogéniques, par couplage à un peptide spécifique de récepteurs au VEGF, afin de potentialiser l'effet anti-vasculaire de la PDT. Ce travail de thèse comporte quatre parties.

La **première partie** expose la conception, la synthèse, la purification, et les caractérisations chimiques et photophysiques de ce PS conjugué.

Une étude *in vitro*, sur cellules HUVEC, fait l'objet d'une **deuxième partie**, dans laquelle sont présentés l'impact du greffage du peptide sur la cytotoxicité à l'obscurité du PS, sa cinétique d'incorporation intracellulaire, son affinité pour les récepteurs au VEGF et son activité photodynamique.

La **troisième partie** de ce travail correspond à l'étude *in vivo* de ce PS conjugué chez la souris *nude* xéno greffée en ectopique par un modèle de gliome malin U87, dont des travaux précédents au laboratoire ont montré la riche vascularisation.

Tout d'abord, nous nous sommes attachés à caractériser ce modèle en terme d'expression de NRP-1 et de VEGF diffusible.

Ensuite, nous avons étudié la pharmacocinétique plasmatique du PS conjugué et sa biodistribution, suite à une injection i.v.

Les conditions de PDT (dose de PS, fluence, irradiance) ont été optimisées par une approche originale utilisant les plans d'expériences.

En utilisant cette condition de PDT optimale, l'efficacité du traitement avec le PS conjugué a été comparée à la PDT utilisant le PS non conjugué, par suivi de la croissance tumorale après PDT. L'effet anti-vasculaire a été estimé par suivi du flux sanguin pendant PDT et marquage immunohistochimique des cellules endothéliales 24 heures après PDT.

Les peptides peuvent être dégradés *in vivo* par des peptidases, ce qui, dans notre stratégie, diminuerait fortement la sélectivité de notre PS pour les néovaisseaux. Dans une **quatrième partie** sont ainsi présentées les conclusions d'une étude de stabilité *in vivo* et *in vitro* du PS conjugué.

## IV RESULTATS

### IV.1 SYNTHÈSE ET ÉTUDE PHOTOPHYSIQUE

#### IV.1.1 Introduction

Le PS utilisé comme base de notre nouveau PS conjugué est la 5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphényl-chlorine (notée TPC par la suite). C'est un PS de 2<sup>ème</sup> génération de type chlorine, avec des propriétés photophysiques intéressantes. De plus, la présence d'un groupement carboxyle permet un couplage aisé sur la fonction amine d'un peptide, *via* la formation d'une liaison amide.

Le peptide utilisé comme molécule ciblant les récepteurs au VEGF (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, noté ATWLPPR, voir *tableau 6*, page 43) a été identifié par *phage display* sur un anticorps anti-VEGF censé mimer le site de reconnaissance du VEGF sur VEGFR-2/KDR. Il a ainsi été présenté dans la littérature comme spécifique de KDR<sup>(278)</sup>. ATWLPPR déplace la fixation du VEGF à des cellules d'ovaires de hamster transfectées avec KDR (IC<sub>50</sub>~80 µM)<sup>(278)</sup> ; il inhibe spécifiquement la prolifération de cellules endothéliales induite par le VEGF de manière dose-dépendante, et inhibe l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de cornée de lapin<sup>(278)</sup>.

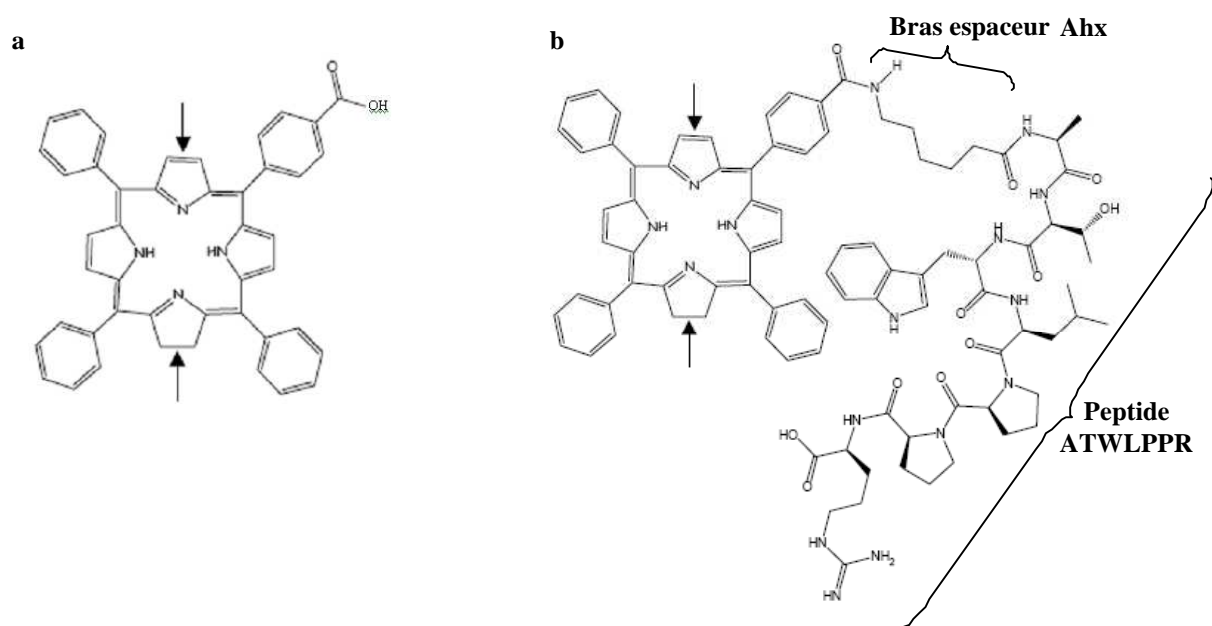
Le site d'attachement du PS sur le peptide a été choisi en N-terminal, d'une part pour des facilités de couplage lors de la synthèse sur support solide, et, d'autre part, de manière à laisser libre l'arginine présente en position C-terminale, cruciale pour l'affinité du peptide. En effet, un Ala-scan réalisé sur le peptide ATWLP<sub>(1)</sub>P<sub>(2)</sub>R a montré que le remplacement de l'arginine par une alanine supprimait totalement l'activité du peptide. L'ordre d'importance des autres acides aminés est le suivant : L, T, P<sub>(1)</sub>, W, et P<sub>(2)</sub>, avec des pertes d'activité de 69, 39, 35, 30 et 16%, respectivement, suite au remplacement par une alanine<sup>(426)</sup>. Si le peptide ATWLPPR n'a pas été sélectionné à partir de la séquence du VEGF, mais par une stratégie de *phage display*, il est intéressant de noter qu'il présente une similarité de séquence en acides aminés avec l'exon 8 du VEGF (PPR et PRR, respectivement) (*Figure 6A*, page 20). A noter qu'un autre peptide se liant à la NRP-1 (TKPPR, *tableau 6*, page 43) présente également cette similarité de séquence.

Le PS et le peptide présentent des masses moléculaires comparables (environ 661 et 840 g/mol, respectivement). Afin de limiter l'encombrement stérique du PS sur le peptide, qui

## Partie IV : Résultats

pourrait affecter l'affinité de ce dernier pour les VEGFRs, un bras espaceur (acide aminohexanoïque ou aminocaproïque, Ahx) a été utilisé pour coupler les deux molécules. La nature et la longueur de ce bras peuvent influencer sur la capacité de reconnaissance du peptide<sup>(427, 428)</sup>. La molécule TPC et le PS conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR sont représentés sur la *figure 29*.

La synthèse du composé TPC-Ahx-ATWLPPR a été réalisée en collaboration avec le Dr Régis Vanderesse (Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC), Nancy-Université). Les étapes de purification et les études photophysiques ont été effectuées sous la direction du Dr Céline Frochot (Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR), ENSIC, Nancy-Université), sauf pour la caractérisation en biphoton qui a été faite par l'équipe du Pr Mireille Blanchard-Desce et du Dr Martijn Werts (groupe Synthèse et Electrosynthèse Organiques, Institut de Chimie, Université de Rennes). Les analyses par spectrométrie de masse ont été réalisées par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, dirigé par le Pr Jean-François Muller, à Metz.



**Figure 29.** Structure chimique des molécules TPC (a) et TPC-Ahx-ATWLPPR (b). Il existe deux isomères de chacune de ces molécules, correspondant à la réduction d'une double liaison à l'un des emplacements indiqués par les flèches. Un seul isomère est représenté ici.

### IV.1.2 Matériel et Méthodes

#### IV.1.2.1 Synthèse peptidique sur phase solide

La chimie peptidique fournit les méthodes d'activation des groupes carboxyliques et de couplage, et d'élimination des groupes protecteurs limitant les réactions secondaires indésirables. Si la synthèse peptidique peut se faire en phase liquide, Bruce Merrifield a révolutionné le domaine en 1963 avec sa technique de synthèse sur phase solide (SPPS), pour laquelle il reçoit le prix Nobel en 1984<sup>(429)</sup>. Chacune de ces méthodes (solution, phase solide) possède ses propres avantages. Même si la synthèse en solution ne requiert pas une étape supplémentaire de clivage de la résine et permet d'obtenir de plus grandes quantités de produit, nous avons, quant à nous, retenu une synthèse sur phase solide, facilement automatisable, qui simplifie les étapes de purification intermédiaires (simples lavages) et finale, et qui permet une réaction complète grâce à un excès de réactifs.

Cette méthode utilise une résine insoluble, sur laquelle sont greffés successivement les différents acides aminés qui composent le peptide. La synthèse se fait du C- vers le N-terminal, à l'opposé de la synthèse protéique par les ribosomes. La résine (qui gonfle dans des solvants de type dichlorométhane) est placée dans un réacteur, dans lequel on fait passer successivement un solvant contenant chacun des acides aminés et des catalyseurs de couplage, en excès. La résine sur laquelle est greffé le peptide en croissance est maintenue dans le réacteur, tandis que, à la fin de chaque étape, des lavages permettent d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi (*Figure 30*). Le temps de synthèse en est considérablement réduit (d'autant plus que le système peut être automatisé), et cela permet de simplifier les étapes de purification ultérieures.

Pour la synthèse en phase solide, il faut :

- Disposer de **groupements protecteurs de la fonction -NH<sub>2</sub>** à engager dans la prochaine liaison peptidique, qui puissent être enlevés spécifiquement entre chaque étape de couplage, sans toucher aux protections latérales. La méthode Merrifield classique utilise le groupement Boc (*tertio*-butyloxycarbonyle), labile en milieu acide (*e.g.* acide trifluoroacétique, TFA). Le clivage final du peptide de la résine requiert l'utilisation d'acides forts (*e.g.* HF), dont l'utilisation est délicate. Nous avons quant à nous retenu une stratégie de type **Fmoc** (N-(9-fluorényl-méthoxycarbonyl))<sup>(430)</sup>, labile dans des

conditions basiques douces (*e.g.* 20% pipéridine dans de la diméthylformamide, DMF). La déprotection des chaînes latérales des acides aminés (protégées par des groupes de type *tertio*butyl) et le clivage du peptide de la résine sont effectués en présence de TFA, et de pièges à espèces réactives (phénol, thiols, silanes, eau) qui capturent les carbocations et radicaux formés et les empêchent de se fixer sur les sites sensibles du peptide.

- Et, disposer d'une stratégie **d'activation de la fonction -COOH** de l'acide aminé à introduire dans le peptide, qui permette des rendements de couplage supérieurs à 99%. L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer le H du COOH par un groupement bon partant. Les solutions courantes sont l'utilisation d'esters activés ou d'anhydrides symétriques. La réaction doit être rapide et totale, aussi travaille-t-on avec de larges excès molaires d'acides aminés activés (3 à 10). Nous avons retenu une stratégie utilisant les esters activés d'hydroxybenzotriazole (**HOBt**) formés *in situ*, en utilisant le réactif de Knorr (trifluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, **TBTU**)<sup>(431)</sup>. La présence de HOBt semble diminuer les réactions secondaires de racémisation. Une amine tertiaire (*e.g.* diisopropyl-éthyl-amine, **DIEA**) est utilisée pour capturer le contre-anion PF<sub>6</sub><sup>-</sup>.

Notre protocole expérimental est le suivant. La résine (Fmoc-Arg(Pmc)-Wang résine) est placée dans le réacteur, et gonflée. Le groupe Fmoc présent en position N-terminale de l'arginine est enlevé en traitant la résine avec de la pipéridine (20% dans de la DMF). Les acides aminés sont alors successivement greffés, en ajoutant du Fmoc-aminoacide (3 éq.), TBTU (3 éq.), HOBt (3 éq.) et DIEA (9 éq.) dans de la DMF, en réalisant des doubles couplages (temps de couplage d'environ 20 min chacun). L'efficacité des couplages est suivie par test à l'acide trinitrobenzène sulfonique, dans le méthanol, sauf dans le cas des couplages impliquant une proline, pour lesquels nous avons utilisé un test au *p*-chloranile, dans l'acétone. Si l'acide aminé a bien été greffé au peptide sur la résine, le groupement N-terminal est bloqué par un Fmoc, et les billes de résine restent incolores ; dans le cas contraire, elles se colorent en orange. Des lavages sont alors effectués pour éliminer les réactifs en excès et le groupement Fmoc de l'acide aminé nouvellement greffé est enlevé avec 20% de pipéridine. On répète le protocole ci-dessus pour greffer successivement tous les acides aminés et le bras espaceur acide aminohexanoïque (pour la synthèse de Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-ATWLPPR). Les groupements latéraux du tryptophane et de la thréonine sont protégés par des groupements Boc et *tertio*-butyl, respectivement. Pour la synthèse de TPC-Ahx-ATWLPPR, l'étape suivante consiste à greffer le PS. Nous utilisons 2 éq. de TPC, en simple

## Partie IV : Résultats

couplage (afin de limiter la quantité de PS, relativement onéreux), mais avec un temps de couplage plus long (de l'ordre de 16 heures). A cette étape, un soin particulier est apporté afin d'éviter tout contact du PS avec la lumière.

La résine est ensuite séchée sous vide en dessiccateur pendant au moins 3 heures, puis la molécule (ATWLPPR, Ahx-ATWLPPR ou TPC-Ahx-ATWLPPR) est clivée de son support avec un mélange TFA(82,5%) /phénol(5%) /thioanisole(5%)/1,2-éthanedithiol(2,5%) /eau(5%), avec refroidissement dans du méthanol à 0°C lors de l'ajout de la solution de clivage à la résine, puis agitation à température ambiante pendant 1h30. ATWLPPR et Ahx-ATWLPPR sont précipités dans l'éther, remis en solution, puis lyophilisés avant purification. TPC-Ahx-ATWLPPR est récupéré directement pour les purifications.

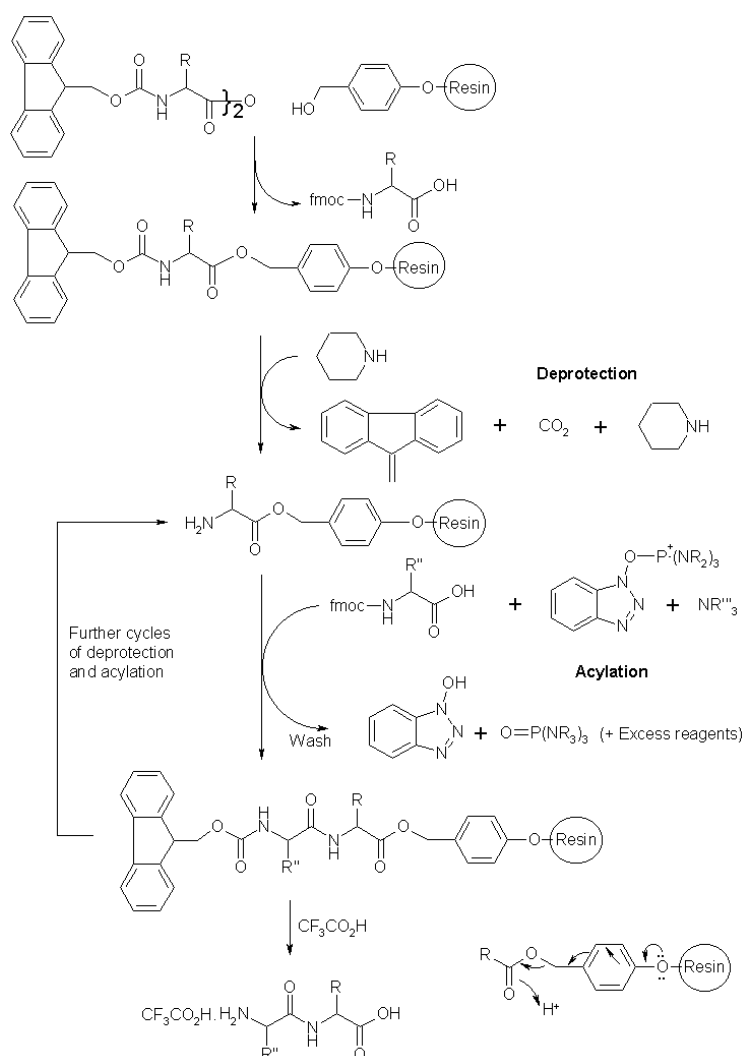


Figure 30. Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide. La fonction amine du peptide en croissance est d'abord déprotégée, puis on ajoute l'acide aminé suivant activé en C-terminal. La résine est alors lavée pour éliminer l'excès d'acide aminé ne s'étant pas couplé sur la résine. Les étapes précédentes sont alors répétées pour l'addition de chacun des acides aminés suivants (du C- vers le N-terminal). Lorsque tous les acides aminés ont été couplés, le peptide est déprotégé en N-terminal, puis un traitement acide au TFA enlève les protections latérales du peptide et le libère du support solide. Le peptide est ensuite purifié puis caractérisé.

### IV.1.2.2 Purifications

Suite à la séparation du support solide, le mélange obtenu doit contenir notre molécule (ATWLPPR, Ahx-ATWLPPR ou TPC-Ahx-ATWLPPR), mais peut aussi être composé d'autres peptides, notamment des peptides de délétion et des peptides ayant subi des modifications sur les chaînes latérales ou des réactions d'oxydation.

Nous effectuons donc une purification par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse, avec une colonne semi-préparative RP-18 (250 × 10 mm, 5 µm, Apollo Alltech).

Le peptide ATWLPPR et le peptide couplé au bras espaceur Ahx-ATWLPPR sont purifiés en utilisant un gradient d'eau-TFA 0,1% (v/v) (A) et d'acétonitrile (B) (25 à 100% de B en 30 min), avec un débit de 4 mL/min et une détection par absorbance à 280 nm sur un détecteur UV-visible SPD-10A (Shimadzu). Les composés sont ensuite lyophilisés et gardés à -20°C.

TPC-Ahx-ATWLPPR est purifié sur la même colonne avec un gradient d'eau-TFA 0,1% (v/v) (A) et de méthanol (B) (75 à 100% de B en 15 min puis 100% de B), avec détection par absorbance à 280 et 415 nm. TPC-Ahx-ATWLPPR est précipité dans l'hexane, séché et dissout dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à une concentration de 2 mM, aliquoté et gardé à l'obscurité à -20°C.

### IV.1.2.3 Caractérisations chimiques

#### IV.1.2.3.1 Spectrométrie de masse

La vérification de l'obtention de ATWLPPR, Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-ATWLPPR a été faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization –time of flight*). La technique de MALDI permet une ionisation douce des composés étudiés, qui sont désorbés par laser depuis une matrice déposée sur une surface métallique. Les molécules sont ionisées puis analysées en fonction de leur rapport masse/charge par un spectromètre à temps de vol (TOF), en utilisant la propriété de déviation d'une particule chargée dans un champ électrique. Les conditions expérimentales utilisées ont été détaillées dans une de nos publications <sup>(432)</sup>.

### IV.1.2.3.2 Résonance Magnétique Nucléaire

L'identité de ATWLPPR et Ahx-ATWLPPR a également été vérifiée par RMN du proton à 200 Hz, en solution dans du DMSO deutéré, avec une concentration d'environ 10 mM. La RMN consiste à faire passer le moment magnétique nucléaire du niveau de plus basse énergie à celui de plus haute énergie («retournement» de spin) par absorption d'un photon : lorsque l'énergie du photon (et donc la fréquence de l'onde électromagnétique) permet cette transition, il y a résonance. La transition du spin vers son retour à l'équilibre (la relaxation) entraîne l'émission d'une onde électromagnétique qui peut être détectée par un capteur. L'environnement chimique des atomes d'hydrogène qui sont reliés chimiquement aux molécules de l'échantillon influent sur la fréquence de résonance  $\nu$  de ceux-ci. On utilise le «déplacement chimique», noté  $\delta$ , et exprimé en parties par million (ppm), qui se réfère à une fréquence de retournement de spin étalon, celle du tétraméthylsilane, que l'on introduit dans l'échantillon :  $\delta = 1\ 000\ 000 \times (\nu_{\text{tétraméthylsilane}} - \nu) / \nu_{\text{tétraméthylsilane}}$ .

### IV.1.2.3.3 Caractère hydrophile/hydrophobe

Le caractère hydrophile/hydrophobe d'une molécule thérapeutique est relié, notamment, à son absorption, sa biodisponibilité, son métabolisme ou sa toxicité. Nous l'avons quantifié pour TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR par une méthode *shake flask*, et, de façon qualitative, par HPLC, en comparant les temps de rétention des composés dans les mêmes conditions chromatographiques.

- **Coefficient de distribution octanol/PBS (pH 7,4)**

Le coefficient de distribution D (exprimé sous forme  $\log D$ ) permet d'estimer le rapport de solubilité d'un composé dans un solvant apolaire (généralement, l'octanol) et dans un solvant polaire (dans notre cas, le PBS, *phosphate buffered saline*, pH 7,4). Nous avons utilisé une méthode *shake flask*, avec une détection par HPLC, comme détaillé dans une de nos publications<sup>(432)</sup>.

- **Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse**

Nous avons également utilisé la HPLC comme méthode d'estimation de l'hydrophobie. Les conditions chromatographiques sont similaires à celles utilisées pour la



purification, mais sur colonne analytique (250 × 4,6 mm, 5 μm, Apollo Alltech), avec un débit de 1 mL/min. Cette méthode permet de comparer les hydrophobies relatives de TPC et de TPC-Ahx-ATWLPPR, *via* leur temps de rétention dans la colonne chromatographique (en phase inverse, les composés les plus polaires sont moins retenus sur la colonne, et donc élués en premier).

### IV.1.2.4 Caractérisations photophysiques

#### IV.1.2.4.1 Absorption UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol ont été déterminés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 2. L'absorbance (A), ou densité optique (DO), est définie comme :  $A = DO = \log(I_0/I)$ , où  $I_0$  représente l'intensité incidente et  $I$  l'intensité transmise. L'absorbance de la solution de PS étudiée est déterminée à chaque longueur d'onde comprise entre 300 et 800 nm, afin d'obtenir un spectre d'absorption sur cette plage.

Les coefficients d'extinction molaire  $\epsilon$  ( $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), caractéristiques des propriétés d'absorption intrinsèques des PS à une longueur d'onde  $\lambda$  donnée, peuvent alors être déduits, connaissant la concentration de PS dans la solution ( $c$ , en  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) et la longueur du trajet optique ( $l$ , en cm) en utilisant la relation de Beer-Lambert :

$$A = \log(I_0/I) = \epsilon \cdot l \cdot c$$

#### IV.1.2.4.2 Fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3, thermostaté à 25°C, équipé d'une lampe Xénon 450 W et d'un double monochromateur. Afin de ne pas avoir d'effet de peau, l'absorbance des solutions est maintenue inférieure à  $0,20 \pm 0,02$ . Nous utilisons une solution aqueuse de fluorescéine à  $0,16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  comme référence (afin de s'affranchir d'éventuelles variations d'intensité de la source lumineuse), une excitation à 415 nm, une largeur de bande passante de 1,885 nm et un temps d'intégration d'une seconde. Les rendements quantiques de fluorescence  $\Phi_{\text{fluo}}$  de TPC et TPC-

## Partie IV : Résultats

---

Ahx-ATWLPPR sont déterminés dans l'éthanol, en utilisant la tétraphénylporphyrine (TPP) ( $\Phi_{\text{fluo}} = 0,11$  dans le toluène <sup>(433)</sup>) comme référence:

$$\Phi_{\text{fluo}} = \Phi_{\text{fluo(ref)}} \times \frac{I}{I_{\text{ref}}} \times \frac{A_{\text{ref}}}{A} \times \left( \frac{n}{n_{\text{ref}}} \right)^2$$

Où : A et  $A_{\text{ref}}$  sont l'absorbance à 415 nm de l'échantillon et de la TPP, respectivement  
I et  $I_{\text{ref}}$  sont les aires sous les spectres de fluorescence entre 600 et 750 nm de l'échantillon et de la TPP, respectivement  
n et  $n_{\text{ref}}$  sont les indices de réfraction des solvants utilisés pour l'échantillon et la TPP, respectivement ( $n = n_{\text{(éthanol)}} = 1,361$  ;  $n_{\text{ref}} = n_{\text{(toluène)}} = 1,496$ ).

### IV.1.2.4.3 Rendement quantique d'oxygène singulet

Les PS étudiés sont excités à l'aide d'une lampe Xénon à arc placée sur un SPEX 1680 possédant un double monochromateur de 0,22  $\mu\text{m}$ . La luminescence de l'oxygène singulet, suite à une excitation à 415 nm, est ensuite mesurée à 1270 nm *via* un monochromateur PTI S/N 1565 grâce à un détecteur IR de la société North Coast Scientific refroidi à l'azote liquide (modèle EO-817L). Les rendements quantiques d'oxygène singulet  $\Phi_{\Delta}$  de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR sont déterminés dans l'éthanol et le chloroforme, en utilisant le rose bengal ( $\Phi_{\Delta} = 0,68$  dans l'éthanol <sup>(434)</sup>) et la TPP ( $\Phi_{\Delta} = 0,55$  dans le chloroforme <sup>(435)</sup>) comme références, respectivement :

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta(\text{ref})} \times \frac{I}{I_{\text{ref}}} \times \frac{A_{\text{ref}}}{A}$$

Où : A et  $A_{\text{ref}}$  sont l'absorbance à 415 nm de l'échantillon et de la référence (rose de bengal ou TPP), respectivement  
I et  $I_{\text{ref}}$  représentent l'intensité du pic de luminescence à 1270 nm de l'échantillon et de la référence, respectivement.

L'absorbance de la TPP ainsi que celle des composés étudiés est maintenue inférieure à  $0,20 \pm 0,02$  pour toutes les longueurs d'onde.

### IV.1.2.4.4 Sections efficaces d'absorption à deux photons

Les sections efficaces d'absorption à deux photons (notées  $\sigma_2$ , exprimées en Göppert-Mayer, GM =  $10^{-50}$  cm<sup>4</sup>.photon<sup>-1</sup>.s<sup>-1</sup>) de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR sont déterminées en mesurant la fluorescence induite par excitation biphotonique, par rapport à une référence ( $10^{-4}$  M de fluorescéine dans 0,1 M de NaOH). La source d'excitation est un laser titane-saphir fonctionnant en régime impulsionnel femtoseconde (durée de l'impulsion 150 fs, cadence 76 MHz). Les longueurs d'onde utilisées se situent entre 800 et 920 nm, et la puissance d'excitation est inférieure à 30 mW (modulée par des filtres de densité neutres, et mesurée par une photodiode). Le faisceau laser est focalisé par un objectif de microscope (10x, NA 0,22) dans la cuve contenant la solution, et le même objectif récolte la fluorescence générée (microscopie à épifluorescence). Le passage au travers d'un miroir dichroïque (Chroma 780dcxruv), qui réfléchit toutes les longueurs d'onde inférieures à 780 nm, d'un filtre d'émission (Chroma e750sp-2p), qui absorbe les résidus de la lumière excitatrice, puis d'une lentille achromatique, va permettre la détection de la fluorescence générée par un spectromètre CCD (BW-TEK BT112E). Pour chaque longueur d'onde d'excitation et pour chaque échantillon, il est vérifié que l'intensité du signal de fluorescence montre une dépendance quadratique vis-à-vis de la puissance d'excitation. La dépendance quadratique montre que c'est bien une excitation biphotonique qui est à l'origine de la fluorescence observée, et que nous travaillons dans un régime où il n'y a pas de contributions de saturation ou de photoblanchiment au signal.

Les sections efficaces sont déterminées par comparaison avec la référence (indice R)<sup>(436)</sup>, en utilisant la formule suivante<sup>(437)</sup> :

$$\frac{(\sigma_2 \Phi)}{(\sigma_2 \Phi)_R} = \frac{\eta_{\text{spectral,R}}}{\eta_{\text{spectral}}} \frac{n^2}{n_R^2} \frac{C_R}{C} \frac{n_R}{n} \left( \frac{F}{P^2} \right) \left( \frac{F}{P^2} \right)_R^{-1}$$

Où :  $\Phi$  est le rendement quantique de fluorescence

$\eta_{\text{spectral}}$  est un paramètre permettant de rendre compte de la dépendance de la réponse de l'optique (filtres, détecteur) à la longueur d'onde

$n$  est l'indice de réfraction du solvant

$C$  est la concentration

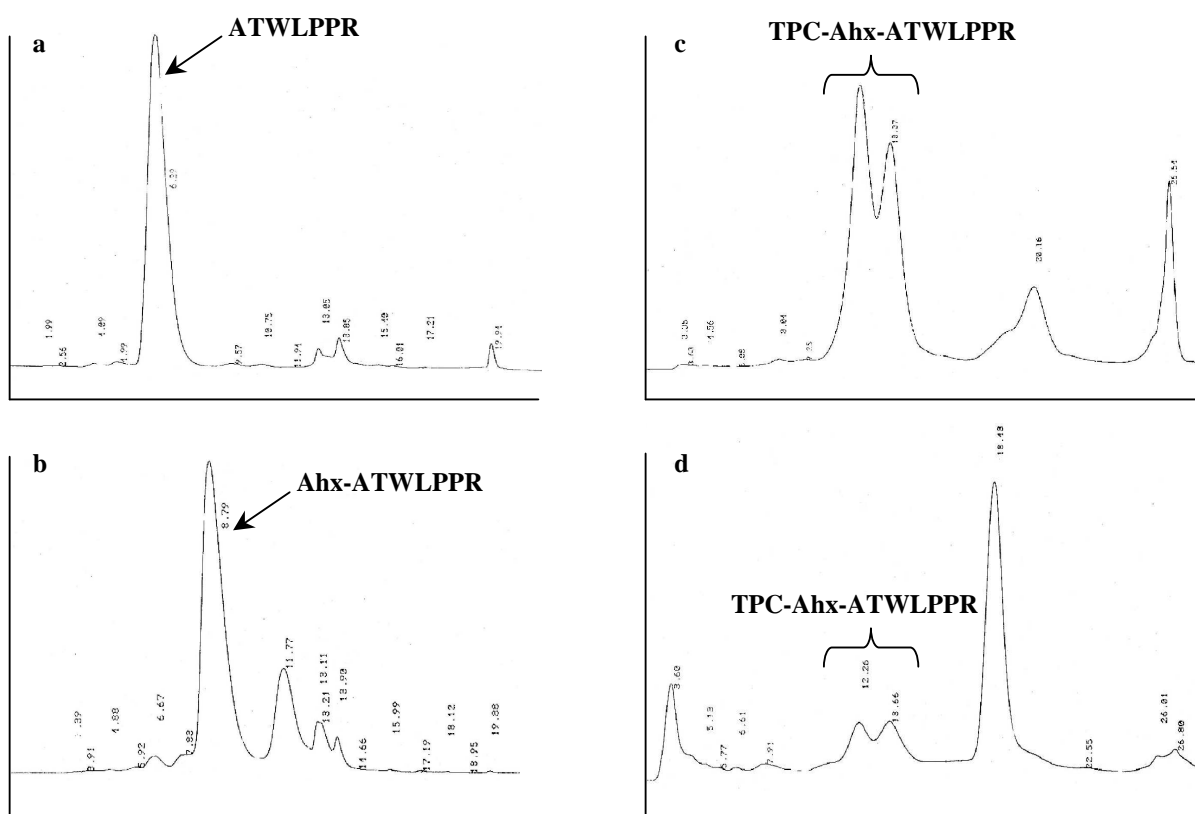
$P$  est la puissance d'excitation moyenne

$F$  est le signal de fluorescence mesuré

## IV.1.3 Résultats et Discussion

## IV.1.3.1 Synthèse, purifications et identité chimique

La synthèse sur support solide nous a permis d'obtenir des composés bruts relativement purs, comme en témoignent les profils chromatographiques relativement «propres» enregistrés (*Figure 31*), en particulier pour le peptide ATWLPPR. L'identité de nos molécules a été vérifiée par spectrométrie de masse (*Figure 32*) et par RMN (*Tableaux 9 et 10*).



**Figure 31.** Profils chromatographiques de ATWLPPR, Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-ATWLPPR avant purifications, avec détection par absorbance à 280 ou 415 nm. (a) ATWLPPR à 280 nm. (b) Ahx-ATWLPPR à 280 nm. (c) TPC-Ahx-ATWLPPR à 415 nm. (d) TPC-Ahx-ATWLPPR à 280 nm.

On peut noter que TPC-Ahx-ATWLPPR est éluée sous forme d'un double pic en HPLC (*Figure 31*), du fait de l'existence de deux isomères de cette molécule, résultant de son caractère asymétrique (*Figure 29*, page 87).

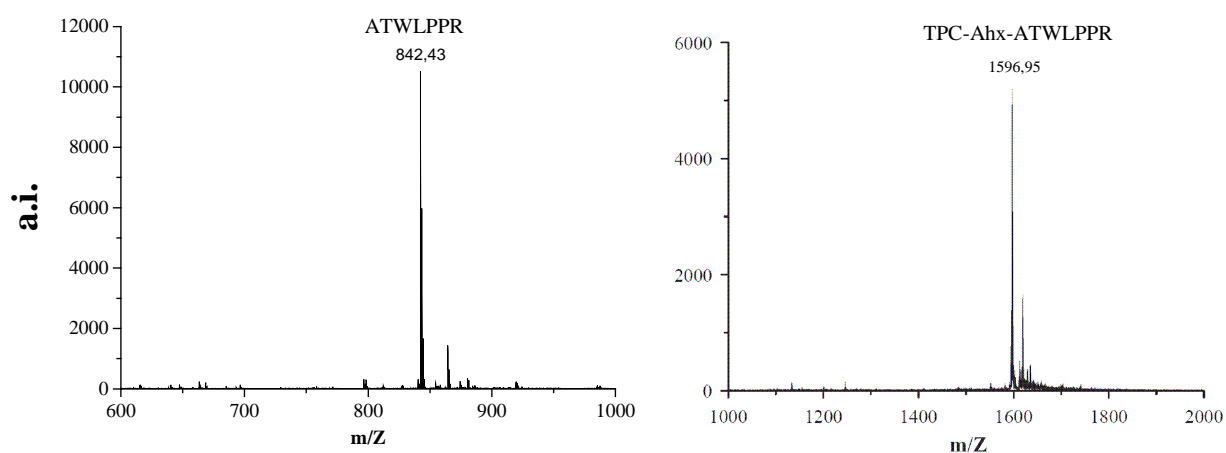


Figure 32. Spectres de masse MALDI-TOF de ATWLPPR (à gauche) et TPC-Ahx-ATWLPPR (à droite), après purifications.

Tableau 9. Déplacements chimiques des protons de ATWLPPR dans le DMSO deutéré.

	NH	$\alpha$ -H	$\beta$ -H	$\gamma$ -H	$\delta$ -H	autres
<b>Ala</b>		3,95	1,05 ; 1,03			
<b>Thr</b>	8,36	4,33	3,95	1,04		
<b>Trp</b>	7,88	4,56	3,10 ; 3,01			5H=6,95 ; 2H,6H=6,97 ; 7H=7,30 4H=7,53 ; 1H=10,79
<b>Leu</b>	8,11	4,53	1,58 ; 1,24	1,27	0,86	
<b>Pro</b>		4,53	2,1 ; 1,9	1,80	3,49	
<b>Pro</b>		4,33	2,0 ; 1,8	1,90	3,56	
<b>Arg</b>	8,00	4,13	1,82	1,52	3,10	$\epsilon$ -NH=7,52

Tableau 10. Déplacements chimiques des protons de Ahx-ATWLPPR dans le DMSO deutéré.

	NH	$\alpha$ -H	$\beta$ -H	$\gamma$ -H	$\delta$ -H	autres
<b>Ahx</b>	8,15 (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )					c=1,26 ; b,d=1,51 ; a=1,91 ; e=2,73
<b>Ala</b>	8,01	4,33	1,17 ; 1,15			
<b>Thr</b>	7,51	4,19	3,98	0,98		
<b>Trp</b>	7,72	4,54	3,12 ; 2,98			5H=6,96 ; 2H,6H=7,04 ; 7H=7,15 4H=7,31 ; 1H=10,78
<b>Leu</b>	8,00	4,52	1,6 ; 1,38	1,60	0,85	
<b>Pro</b>		4,51	1,91 ; 1,80	1,78	3,68	
<b>Pro</b>		4,33	2,05 ; 1,83	1,91	3,70	
<b>Arg</b>	7,65	4,18	1,61	1,52	3,09	$\epsilon$ -NH=7,52

Nous avons démontré la faisabilité de coupler un PS de type chlorure à un peptide greffé sur support solide, sans dommages à la chlorure, malgré les conditions acides de clivage. D'autres études ont également utilisé cette méthode de synthèse sur support solide pour le couplage d'un PS à un peptide<sup>(438-441)</sup>.

### IV.1.3.2 Caractère hydrophile/hydrophobe

La méthode *shake flask* nous a donné des valeurs de  $\log D_{pH\ 7,4}$  de  $2,5 \pm 0,2$  et de  $2,6 \pm 0,2$  pour TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR, respectivement. Cette méthode ne nous donne donc pas des valeurs significativement différentes entre ces deux composés, et montre qu'ils sont très hydrophobes. La méthode HPLC, plus précise, montre cependant que l'ajout du peptide ATWLPPR diminue le caractère hydrophobe du PS, comme en témoignent les temps de rétention respectifs de TPC-Ahx-ATWLPPR et TPC ( $t_R = 16,0$  et  $16,6$  min pour les deux isomères de TPC-Ahx-ATWLPPR ;  $t_R = 18,7$  et  $19,4$  min pour les isomères de TPC).

### IV.1.3.3 Caractérisations photophysiques

#### IV.1.3.3.1 Absorption, fluorescence et génération d'oxygène singulet

Les profils spectraux d'absorption et d'émission de fluorescence sont conservés entre TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR. Les spectres d'absorption et d'émission de TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol sont représentés sur la *figure 33*. Le spectre d'absorption est caractéristique d'une chlorine, avec un dédoublement de la bande de Soret (non observé pour les porphyrines), et une forte absorption à 651 nm (bande Q<sub>I</sub>). De même, le spectre d'émission est caractéristique de ce type de composé, avec un maximum d'intensité à 652 nm, et un pic secondaire vers 720 nm (ce pic secondaire est beaucoup plus prononcé pour les porphyrines).

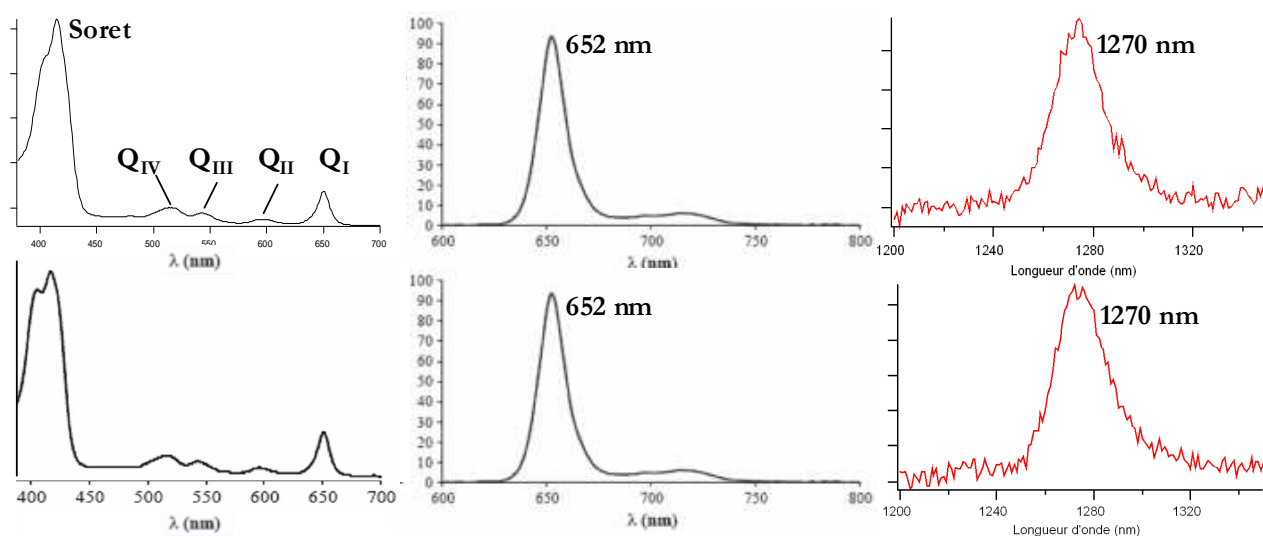


Figure 33. Spectres d'absorption (*gauche*), d'émission de fluorescence, suite à une excitation à 415 nm (*milieu*) et de luminescence de l'oxygène singulet (*droite*) de TPC (*haut*) et TPC-Ahx-ATWLPPR (*bas*), dans l'éthanol.

## Partie IV : Résultats

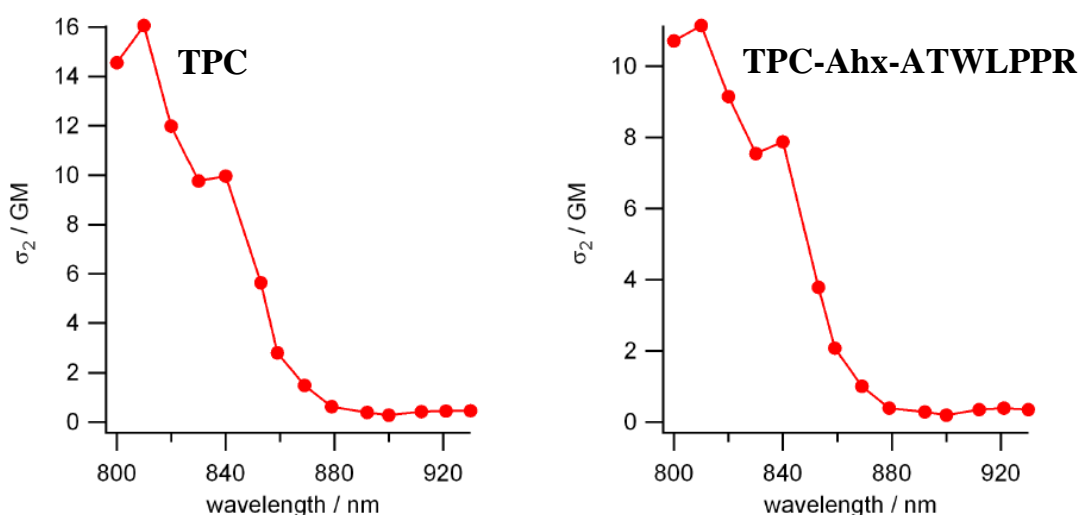
Les propriétés photophysiques (coefficients d'extinction molaire correspondant aux différents pics d'absorption, rendements quantiques de fluorescence et de formation d'oxygène singulet) de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR sont similaires (*Tableau 11*).

**Tableau 11. Propriétés photophysiques de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol.**

	Coefficient d'extinction molaire $\epsilon$ ( $10^3 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )					$\Phi_{\text{fluo}}$	$\Phi_{\Delta}$
	Soret (415 nm)	$Q_{IV}$ (516 nm)	$Q_{III}$ (543 nm)	$Q_{II}$ (598 nm)	$Q_I$ (651 nm)		
<b>TPC</b>	76,0	8,0	5,0	4,0	12,0	0,18	0,61
<b>TPC-Ahx-ATWLPPR</b>	74,0	6,8	4,9	2,6	15,0	0,18	0,64

### IV.1.3.3.2 Excitation biphotonique

L'absorption à deux photons est un phénomène du troisième ordre très étudié en optique non linéaire. Si la densité de photons par unité de volume et de temps est suffisante, deux photons se couplent pour induire une transition vers un état excité dont l'énergie correspond à la somme des énergies de chacun des deux photons. Après absorption, les processus de relaxation et d'émission sont les mêmes que ceux de la fluorescence à un photon. Cette approche présente plusieurs avantages : confinement du volume traité avec limitation des photodommages aux tissus sains et meilleure pénétration dans les tissus avec une excitation dans le proche infrarouge.



**Figure 34. Spectres d'excitation biphotonique de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol.**

Comme on peut le noter sur la *figure 34*, les spectres d'absorption biphotonique de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR présentent un maximum d'absorption biphotonique vers 810 nm. Les sections efficaces  $\sigma_2$  maximales de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR sont proches, de l'ordre de 10-16 GM. En comparaison, les valeurs correspondantes pour des hypocrellines (validées comme agents potentiels pour une excitation biphotonique) à 800 nm sont de l'ordre de 20-35 GM<sup>(442)</sup> ; pour le Photofrin®, cette valeur est de l'ordre de 10 GM<sup>(443)</sup>. Nos composés présentent donc des sections efficaces  $\sigma_2$  non négligeables, mais cependant non idéales, puisque des valeurs supérieures à 100 GM sont généralement attendues. Des valeurs plus importantes (3 000 à 10 000 GM) peuvent être obtenues en utilisant des assemblages dimériques de PS<sup>(444, 445)</sup> ; ces études ont également montré la possibilité de génération d'oxygène singulet suite à l'excitation biphotonique.

### IV.1.4 Conclusions

Nous avons démontré la **faisabilité** de coupler un peptide à un PS sur support solide. La méthode de purification par HPLC que nous avons développée permet l'obtention du PS conjugué avec une **haute pureté**.

Le composé TPC-Ahx-ATWLPPR obtenu est relativement **hydrophobe**, tout comme TPC (caractère hydrophobe comparable, selon la méthode *shake flask*), mais, d'après la méthode HPLC, plus précise mais non quantitative, il est légèrement **plus hydrophile** que TPC.

Le PS conjugué présente des **caractéristiques photophysiques comparables** avec celles de TPC, ce qui démontre que le couplage du peptide n'a pas d'influence sur celles-ci. Les deux PS peuvent être excités en mode biphotonique, mais les sections efficaces correspondantes sont trop basses pour envisager véritablement d'utiliser ces PS tels quels pour des études *in vitro* ou *in vivo* en mode biphotonique.



### IV.2 ÉTUDE IN VITRO

Après obtention et caractérisation du composé recherché, l'étape suivante de ce travail a consisté en son étude *in vitro*, sur des HUVEC. Nous avons vérifié que ces cellules endothéliales exprimaient les récepteurs VEGFR-2/KDR et NRP-1, dans nos conditions de culture, par cytométrie de flux et Western blot, respectivement. Une étude comparative avec TPC a montré pour TPC-Ahx-ATWLPPR :

- Une **cytotoxicité à l'obscurité moindre**, pour toutes les concentrations testées. Des concentrations inférieures à 5  $\mu\text{M}$  avec un temps d'incubation de 24 heures montrent un pourcentage de survie des HUVEC supérieur à 85%, avec les deux composés et ont été utilisées pour la suite des études ;
- Une **amélioration de l'incorporation** d'un facteur pouvant aller jusqu'à 25 ;
- Cette incorporation cellulaire est **diminuée** de  $57 \pm 4\%$  en présence d'un excès de peptide ATWLPPR, compétiteur pour les récepteurs au VEGF, ce qui corrobore l'implication de ceux-ci dans le mécanisme d'incorporation ;
- Et, une **activité photodynamique** ( $\text{LD}_{50}$ ) améliorée d'un facteur 10.

Afin de vérifier la reconnaissance de KDR par le peptide ATWLPPR, nous avons réalisé des tests de compétition avec du  $\text{VEGF}_{165}$  biotinylé pour la reconnaissance du récepteur KDR recombinant. De façon surprenante, nous avons noté une absence de déplacement de fixation du  $\text{VEGF}_{165}$  biotinylé même à des concentrations de peptides de l'ordre du mM, alors que le peptide a initialement été décrit comme déplaçant la liaison du VEGF à KDR, en se fixant sur ce dernier<sup>(278)</sup>. En revanche, ATWLPPR se fixe sur la NRP-1 ( $\text{IC}_{50} = 19 \mu\text{M}$ ), de même que TPC-Ahx-ATWLPPR, même si l'affinité du peptide pour le récepteur est réduite suite au couplage avec le PS ( $\text{IC}_{50} = 171 \mu\text{M}$ ). Depuis, les auteurs de l'article ayant permis l'identification du peptide ont montré que **ATWLPPR ne se fixe pas à VEGFR-1/Flt-1 ni à VEGFR-2/KDR, mais à NRP-1** et à NRP-2. Un couplage au technétium en N-terminal abolit la reconnaissance de NRP-2, mais pas de NRP-1<sup>(348, 349)</sup>, ce qui suggère que la molécule TPC-Ahx-ATWLPPR (avec le PS couplé en N-terminal) devrait uniquement reconnaître NRP-1.

Cette étude a été publiée<sup>(350)</sup> et est présentée dans les pages suivantes sous forme d'article.



























### IV.3 ETUDE IN VIVO

Après avoir démontré l'efficacité *in vitro* du PS conjugué, nous avons souhaité évaluer l'efficacité photodynamique de notre molécule *in vivo*, sur un modèle de tumeur richement vascularisée. Ce travail se subdivise en quatre sous-parties :

- **Caractérisation du modèle tumoral**, en terme d'expression du VEGF et de NRP-1 ;
- **Pharmacocinétique plasmatique et biodistribution tissulaire** suite à l'injection i.v. de TPC-Ahx-ATWLPPR ;
- **Détermination des paramètres de PDT** (dose de PS, fluence et irradiance lumineuses), permettant de minimiser la croissance tumorale, par une approche de plan d'expériences ;
- **Et, comparaison de l'activité photodynamique de TPC-Ahx-ATWLPPR et du PS non conjugué TPC**, par suivi du flux tumoral pendant l'irradiation, marquage des vaisseaux 24 heures après PDT, et suivi de la croissance tumorale après traitement.

## IV.3.1 Caractérisation du modèle

### IV.3.1.1 Introduction

Nous avons utilisé un modèle de gliome malin humain, xéno greffé en ectopique chez la souris *nude*. Ce modèle de tumeur induit par la lignée tumorale U87 est décrit dans la littérature comme étant résistant à la radiothérapie<sup>(419)</sup>, d'où l'intérêt d'évaluer sa réponse à la PDT. De plus, des travaux précédents menés au laboratoire ont montré qu'il s'agit d'un modèle richement vascularisé, par marquage immunohistochimique du collagène IV<sup>(446)</sup>. Nous nous sommes attachés à caractériser ce modèle plus précisément, en terme de niveau d'expression de NRP-1, et des taux de VEGF diffusible (taux de VEGF humain et murin, plasmatiques et intratumoraux).

### IV.3.1.2 Matériel et Méthodes

#### IV.3.1.2.1 Modèle animal

Nous avons utilisé pour nos expérimentations des souris *nude* (*nu/nu*) Fox femelles, pesant 20 à 25 g, provenant de chez Harlan (Gannat, France). A leur arrivée à l'animalerie centrale de la Faculté de Médecine de Nancy à l'âge de 6 semaines, les animaux sont placés dans des cages contenant de la litière, par groupes de 5 ou 6, et reçoivent de l'eau et une alimentation non stériles *ad libitum*. Comme le stipule la législation, les premières manipulations sur les animaux ne débutent que 7 à 10 jours après leur arrivée.

La lignée U87 (glioblastome *multiforme* humain, *The American Type Culture Collection*, ATCC HTB-14) est conservée à -80°C. Après décongélation, les cellules sont cultivées en monocouche dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Falcon, Dutscher, Brumath, France), comme décrit précédemment<sup>(446)</sup>. Au début de notre série d'expérimentations, des souris ont été injectées, sans anesthésie, avec 10<sup>6</sup> cellules U87 dans 100 µL de glucose 5% (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), au niveau de la face externe des pattes postérieures droite et gauche<sup>(419)</sup>, et ont servi de premières souris donneuses.

Par la suite, les souris sont greffées avec des fragments tumoraux directement issus de souris donneuses. Lorsque la tumeur d'une souris donneuse atteint un volume d'environ 1000

## Partie IV : Résultats

---

mm<sup>3</sup>, elle est sacrifiée par dislocation cervicale, après anesthésie de l'animal. Le tissu tumoral est prélevé, rincé dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%), et utilisé immédiatement. Il est alors coupé finement, à l'aide d'un scalpel, de façon à obtenir des fragments d'environ 1 à 2 mm. Les parties blanches, d'apparence nécrosée, sont éliminées, alors que les fragments roses, vascularisés, sont utilisés pour les greffes.

Les souris receveuses sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale (0,01 mL/g de poids corporel) de 60 mg/kg de kétamine (Kétalar®, Panpharma, Fougère, France) et 8 mg/kg de xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France), qui sont un anesthésique et un myorelaxant, respectivement. L'anesthésie survient dans les 5 à 10 min suivant l'injection pour une durée d'au moins 30 min. L'animal est alors fixé sur une planchette en polystyrène par ses quatre membres, en décubitus dorsal, au moyen de ruban adhésif de type Micropore, 3M. Les greffons U87 sont implantés en sous-cutané au niveau du pli inguinal gauche de la souris, près de l'artère fémorale. A ce niveau, la peau et le tissu conjonctif sont incisés, et les fragments déposés. Les points de suture cutanée sont réalisés avec du fil de suture Prolène 5/0 stérile (Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). A l'issue de l'intervention, les animaux sont marqués au niveau des oreilles, au moyen d'un système de tatouage (Micro-Tattoo System, Harvard Apparatus, Les Ulis, France). Cela nous a assuré un marquage définitif de l'animal, et nous a permis de distinguer les souris présentes dans une même cage (tatouages de 1 à 6 points sur les oreilles). D'après le fournisseur, des marquages par individu sont également possibles, au niveau des orteils, mais la douleur pour l'animal et les difficultés pour l'expérimentateur (tant d'un point de vue du marquage, que de la lecture ultérieure) ne nous ont pas semblé à la hauteur d'un bénéfice quelconque. Des marquages au niveau de la queue ont également été éliminés afin de ne pas interférer avec les injections i.v. ultérieures. Les animaux sont ensuite placés dans une cage dite «de réveil», au chaud, et surveillés jusqu'à la reprise d'une activité physiologique, après quoi ils sont replacés dans leur cage.

### *IV.3.1.2.2 Expression de NRP-1 par Western blot*

Le protocole pour la détermination de l'expression protéique de NRP-1 par les cellules U87, en comparaison avec des HUVEC et des cellules A549 apparaît dans une de nos publications <sup>(350)</sup>. Brièvement, les cellules en culture monocouche sont récupérées par grattage, lavées avec du PBS froid, lysées dans une solution de 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 1% de 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate, 2 mM d'acide



éthylènediamine tétraacétique (EDTA) and 1 mM de fluorure de *p*-toluène sulfonyl (PMSF) pendant 30 min sur glace, et centrifugées à 15 000 g pendant 20 min à 4°C. La concentration en protéines totales est déterminée par le kit *DC Protein Assay* (BioRad, Marnes-la-Coquette, France), comme décrit précédemment <sup>(419)</sup> (p. 114). 25 µg de protéines sont chauffées à 95°C pendant 7 min en présence de 5% 2-mercaptoéthanol, refroidies sur glace et séparées sur un gel de polyacrylamide 7,5%, suivi d'un transfert électrophorétique sur des membranes de *polyvinylidene difluoride*. Les membranes sont bloquées avec 5% (w/v) de lait (Régilait) dans du TBST (*Tris-buffered saline* contenant 0,1% (v/v) Tween-20) (solution de blocage), pendant une nuit à 4°C. Elles sont alors incubées pendant 1 heure avec un anticorps primaire anti-NRP-1 (C-19, sc-7239, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans la solution de blocage. Après plusieurs rinçages, les membranes sont incubées avec un anticorps secondaire anti-chèvre couplé HRP (*horseradish peroxidase*), dilué au 1/2000<sup>ème</sup>. L'anticorps secondaire est alors détecté en utilisant le système de détection ECL (Amersham Biosciences, Orsay, France) et une visualisation par autoradiographie.

Le taux d'expression de NRP-1 des U87 a été comparé avec celui d'HUVEC et de cellules A549. Pour s'assurer que la quantité de protéines était identique pour tous les types cellulaires, les membranes ont ensuite été strippées et incubées avec un anticorps anti-actine (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology).

### ***IV.3.1.2.3 Taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux par ELISA***

Les taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux chez des souris porteuses de tumeurs U87 ont été mesurés en utilisant des tests ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) commerciaux de détection du VEGF humain et murin (DVE00 et MMV00, respectivement, R&D Systems, Lille, France). Le protocole ELISA est réalisé selon les recommandations du fournisseur, et le mode de préparation des échantillons à tester est le suivant.

Après anesthésie des souris, le sang est récupéré par ponction intracardiaque (voie para-sternale gauche) dans des tubes, avec de l'EDTA comme anti-coagulant (tube Vacutainer® à bouchon violet, Becton-Dickinson). Les tubes sont agités et conservés sur de la glace jusqu'à la centrifugation, réalisée moins de 30 min après le prélèvement (700 g, 10 min,

4°C). Le surnageant (plasma) est alors aliquoté et conservé à -80°C. Les échantillons de plasma sont déposés dans les plaques sans dilution.

Pour la préparation des extraits tumoraux, les souris porteuses de tumeurs de  $5 \pm 1$  mm de diamètre (10 à 20 jours après la greffe) sont sacrifiées par dislocation cervicale, après ponction intracardiaque, comme décrit ci-dessus. La tumeur est alors prélevée, pesée et conservée dans un cryotube à -80°C. Du tampon de lyse (Reporter Lysis Buffer 1x, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) contenant 1 mM de PMSF et des anti-protéases (Pefabloc, Fluka, Sigma-Aldrich, Saint Quentin-Fallavier), ajoutés extemporanément, est utilisé (1 mL/100 mg de tumeur) en combinaison avec un broyage des tissus à l'Ultra-Turrax (30 s). Les broyats sont centrifugés (3 000 g, 15 min, 4°C), afin d'éliminer les débris cellulaires. Le taux de protéines totales est déterminé immédiatement dans le surnageant en utilisant le kit *DC Protein Assay* (BioRad), avec une gamme de standards d'albumine bovine sérique (BSA) de 0 à 1,2 mg/mL, diluée dans le tampon de lyse, comme décrit précédemment. Le surnageant est ensuite aliquoté et conservé à -80°C. Les échantillons d'extraits tumoraux sont dilués (de  $1/4$  à  $1/48^{\text{ème}}$ ) dans le diluant fourni dans le kit, avant d'être déposés dans les plaques d'analyse.

### IV.3.1.3 Résultats et Discussion

#### IV.3.1.3.1 Expression de NRP-1 par les cellules tumorales

Il est mentionné dans la littérature que certaines cellules tumorales expriment NRP-1 (93, 207, 223, 229). De ce fait, nous avons voulu caractériser les cellules U87. La *figure 35* présente les résultats obtenus par Western blot. L'anticorps utilisé (C-19) reconnaît l'extrémité terminale carboxylique de la NRP-1 correspondant à sa portion intracytoplasmique ; il ne reconnaît donc pas les formes solubles de la NRP-1.

On constate une forte expression de NRP-1 par les HUVEC (témoin positif), mais également une légère expression par les cellules U87, en comparaison avec les cellules A549. Le niveau d'expression de NRP-1 dans les U87 reste néanmoins relativement faible, en comparaison avec ceux retrouvés dans d'autres certaines cellules tumorales, telles que des lignées de cancer du sein (MDA-MB-231) ou de la prostate (PC3), qui peuvent être bien plus élevés que les niveaux relevés pour les HUVEC (93, 223).

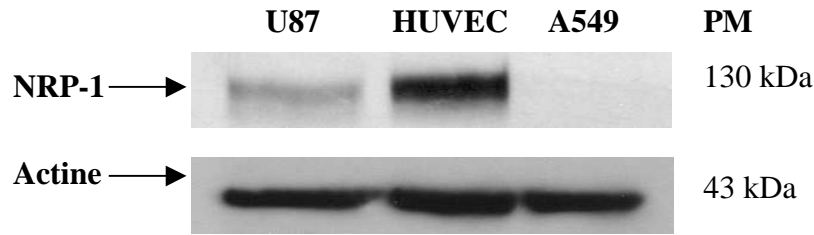


Figure 35. Analyse de l'expression protéique de la NRP-1 de 3 lignées cellulaires (U87, HUVEC et A549) par Western blot.

#### IV.3.1.3.2 Taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux

Il était intéressant de déterminer les taux de VEGF plasmatiques et intratumoraux de notre modèle, puisque le VEGF<sub>165</sub> représente un compétiteur de la molécule TPC-Ahx-ATWLPPR pour la NRP-1. Du fait que notre modèle utilise des cellules humaines, implantées chez la souris, nous avons utilisé deux tests ELISA, l'un détectant le VEGF humain (VEGF sécrété par les cellules tumorales), l'autre le VEGF murin (VEGF sécrété par les cellules de l'hôte, *e.g.* macrophages). Le *tableau 12* présente les résultats obtenus.

Les taux de VEGF humain intratumoraux ( $330 \pm 460$  pg/mg de protéines, n=4) sont comparables avec ceux décrits dans la littérature <sup>(447)</sup>.

Les taux de VEGF plasmatiques (humain et murin) sont de l'ordre de 25 pg/mL, soit environ 0,5 à 0,7 pM (en considérant un poids moléculaire de 35 et 45 kDa pour le VEGF<sub>121</sub> et le VEGF<sub>165</sub> homodimères, respectivement). Ces valeurs sont beaucoup plus basses que les valeurs de  $K_d$  du VEGF pour ses différents récepteurs ( $K_d \sim 10-700$  pM, *tableau 4*, page 21). Elles sont également moins élevées que les taux de VEGF présent dans le milieu de culture des HUVEC (entre 1 et 10 ng/mL, soit 20 à 280 pM, Caroline Berthelot, Cambrex, *communication personnelle*).

Par ailleurs, les kits de R&D Systems permettent de détecter les isoformes diffusibles du VEGF (VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub>), sans pouvoir les distinguer. Les taux de VEGF<sub>165</sub>, compétiteur de la liaison de TPC-Ahx-ATWLPPR à NRP-1 (contrairement au VEGF<sub>121</sub>), sont donc encore moins élevés.

Par conséquent, la quantité de VEGF<sub>165</sub> circulant présente *in vivo* est assez basse pour ne pas entraver la reconnaissance de TPC-Ahx-ATWLPPR par NRP-1.

## Partie IV : Résultats

---

Tableau 12. Taux de VEGF diffusible (humain et murin) plasmatique et intratumoral.

	<i>Taux plasmatiques (pg/mL)</i>	<i>Taux intratumoraux (pg/mg de protéines)</i>
<b>VEGF murin</b>	25 ± 5 (n=4)	3 (n=1)
<b>VEGF humain</b>	23 ± 36 (n=4)	330 ± 460 (n=4)

### IV.3.1.4 Conclusions

Les cellules U87 expriment la NRP-1, mais les taux sont beaucoup plus bas que ceux retrouvés dans les HUVEC ou certaines autres lignées de cellules tumorales, telles que les MDA-MB-231<sup>(207)</sup>.

Par ailleurs, les taux de VEGF (VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub>), qu'il soit d'origine murine ou humaine, retrouvés au niveau plasmatique ou intratumoral, sont très faibles, en comparaison avec les concentrations de VEGF présent dans le milieu de culture utilisé pour notre étude *in vitro*. Par conséquent, la quantité de VEGF<sub>165</sub> présente *in vivo* est assez basse pour **ne pas entraver la reconnaissance de TPC-Ahx-ATWLPPR** par la NRP-1.

### IV.3.2 Pharmacocinétique plasmatique et biodistribution tumorale

#### IV.3.2.1 Introduction

Avant d'entreprendre l'étude d'efficacité *in vivo*, nous avons étudié la biodistribution de la molécule TPC-Ahx-ATWLPPR, suite à une injection i.v. chez des souris greffées avec le modèle de gliome malin U87. Nous avons en particulier déterminé les paramètres de pharmacocinétique plasmatique, et suivi les taux du PS dans le plasma, la tumeur et la peau.

#### IV.3.2.2 Matériel et Méthodes

##### IV.3.2.2.1 Protocole

Les greffes tumorales ont été réalisées comme décrit précédemment (voir paragraphe *IV.3.1.2.1.*, page 115). Lorsque le diamètre moyen des tumeurs atteint  $5 \pm 1$  mm (10 à 20 jours après la greffe), les souris sont injectées, *via* une veine caudale, avec TPC-Ahx-ATWLPPR (0,7 ou 2,8 mg/kg, 200  $\mu$ L/25 g de poids corporel, soit une concentration de TPC-Ahx-ATWLPPR dans la solution à injecter de 55 ou 219  $\mu$ M, respectivement), diluée dans un mélange de PEG 400 (polyéthylène glycol 400) : éthanol : eau (3 : 2 : 5), permettant sa solubilisation<sup>(337)</sup>.

Au bout d'un temps donné après l'injection (1, 2, 4, 6, 8, 16, 24 ou 48 heures), la souris est anesthésiée, et le plasma, la tumeur et la peau sont récupérés, de façon similaire à ce qui est décrit dans le paragraphe *IV.3.1.2.3.* (page 117), sauf que l'anti-coagulant utilisé pour la récupération du plasma est ici l'héparine (tube Vacutainer®, bouchon vert). Le plasma, la tumeur et la peau sont conservés dans des cryotubes à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à extraction du PS, réalisée juste avant le passage en HPLC. Trois à cinq souris par temps ont été utilisées.

##### IV.3.2.2.2 Extraction du PS et méthode HPLC

La méthode d'extraction du PS et les conditions chromatographiques ont été décrites dans deux de nos publications<sup>(350, 432)</sup>.

IV.3.2.3 Résultats et Discussion

Les résultats présentés ci-après ont en partie été publiés <sup>(350)</sup>. La dose de 0,7 mg/kg utilisée pour TPC-Ahx-ATWLPPR est l'équivalent molaire d'une dose de 0,3 mg/kg de Foscan®, couramment utilisée pour les études précliniques <sup>(338, 448)</sup>. Une dose quatre fois supérieure (2,8 mg/kg) a également été utilisée. Les paramètres de pharmacocinétique plasmatique sont comparables pour les deux doses (*Tableau 13*) <sup>(350)</sup>, et valident une élimination du compartiment plasmatique plus rapide que celle du Foscan® ( $K_{el} = 0,03 \text{ h}^{-1}$  ;  $t_{1/2} = 22,6 \text{ h}$ ) <sup>(448)</sup>.

**Tableau 13. Paramètres de pharmacocinétique plasmatique, avec une dose de 0,7 ou 2,8 mg/kg de TPC-Ahx-ATWLPPR, calculés en utilisant une méthode non-compartmentale <sup>(350)</sup>.**

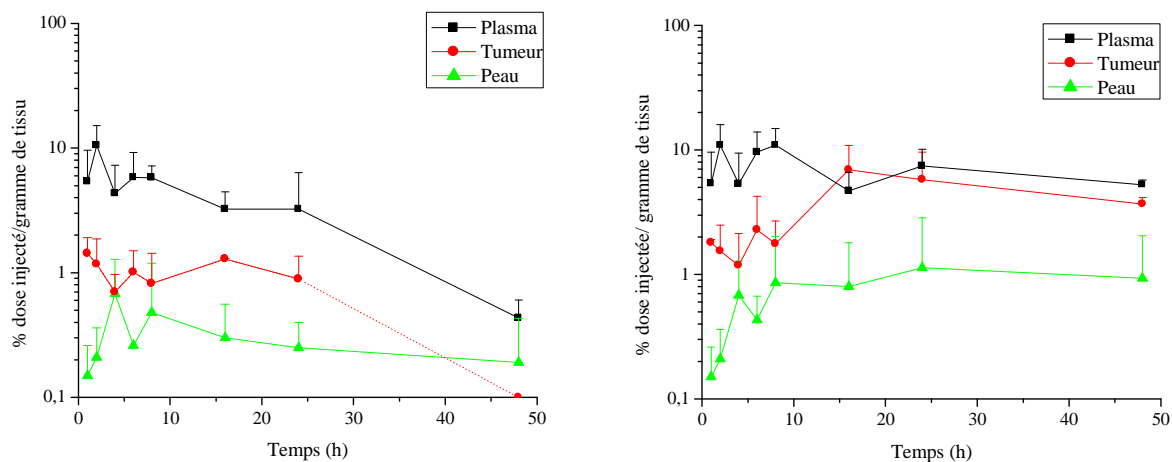
Paramètres pharmacocinétiques	0,7 mg/kg	2,8 mg/kg
Temps de résidence moyen (h)	15,8	19,0
Constante d'élimination $K_{el}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,063	0,053
Temps de demi-vie $t_{1/2}$ (h)	10,9	13,2
Clairance plasmatique $C_L$ (mL/kg/h)	49	36
Volume de distribution $V_d$ (mL/kg)	780	685

Les taux de TPC-Ahx-ATWLPPR, exprimés en pourcentage de la dose injectée par mL de plasma ou par gramme de tissu (tumeur, peau), en fonction du temps après injection, sont représentés sur la *figure 36 (gauche)*. Les taux intratumoraux de TPC-Ahx-ATWLPPR se situent rapidement aux alentours de 1%/g de tumeur (entre 1 et 24 heures après injection i.v.), supérieurs aux taux trouvés au niveau de la peau et aux taux intratumoraux rapportés dans la littérature pour le Foscan® <sup>(350)</sup>. On ne retrouve plus aucune trace de TPC-Ahx-ATWLPPR dans la tumeur 48 heures post-injection (p.i.) (*Figure 36, gauche*).

En parallèle, nous pouvons observer, dans la tumeur, dès 2h après injection i.v., l'apparition d'un composé inconnu, dont les taux augmentent en fonction du temps après injection. Ce composé, caractérisé par un double pic en HPLC, absorbe à 416 nm et émet une fluorescence à 652 nm, ce qui suggère qu'il est structurellement proche de TPC-Ahx-ATWLPPR. Nous avons identifié ce produit, par spectrométrie de masse, comme étant le produit de dégradation TPC-Ahx-A, résultant d'une hydrolyse enzymatique entre les résidus alanine et thréonine du peptide <sup>(432)</sup>. Puisque le macrocycle tétrapyrrolique, responsable du caractère photoactivable de la molécule, est intact, nous avons représenté sur la *figure 36 (droite)* les taux en produits photoactivables totaux (TPC-Ahx-ATWLPPR et produit de

dégradation TPC-Ahx-A). Le produit de dégradation apparaît également dans le plasma et dans la peau, mais à des taux inférieurs à ceux trouvés dans la tumeur.

Une étude détaillée sur la dégradation de TPC-Ahx-ATWLPPR a été réalisée *in vivo*, mais également *in vitro*, dans des HUVEC<sup>(432)</sup>. La cinétique de formation du(des) produit(s) de dégradation, l'identification des liaisons peptidiques sensibles à l'hydrolyse enzymatique, et des organes et organites impliqués dans cette dégradation sont présentés dans la partie **IV.4**, sous forme d'un article soumis pour publication, actuellement sous correction.



**Figure 36.** Quantités de TPC-Ahx-ATWLPPR (*gauche*) ou de produits photoactivables totaux (TPC-Ahx-ATWLPPR et produit de dégradation) (*droite*) présentes dans les tissus, exprimées en pourcentage de la dose injectée par g de tumeur ou de peau, ou par mL de plasma, en fonction du temps après injection i.v. de 2,8 mg/kg de TPC-Ahx-ATWLPPR (moyenne + écart-type, n= 3 à 5).

### IV.3.2.4 Conclusions

Cette étude de pharmacocinétique plasmatique et de biodistribution constitue un préalable indispensable à toute étude d'efficacité *in vivo* d'un nouveau PS, en fournissant notamment des informations essentielles au **choix des conditions de PDT**, en particulier l'IDL. L'IDL favorisant un **effet direct** de destruction des cellules tumorales correspondrait ainsi au temps pour lequel la **concentration intratumorale** en composés photoactivables est maximale. Cependant, ce type d'approche ne permet pas d'estimer la cinétique d'incorporation du PS au niveau des cellules endothéliales des néovaisseaux sanguins tumoraux. Or, cette information est nécessaire à la détermination de l'IDL le plus approprié pour favoriser l'**effet anti-vasculaire** recherché. Dans ce but, nous travaillons actuellement à déterminer la localisation du PS dans les tissus par une méthode de colocalisation du PS avec

**l'endothélium des vaisseaux sanguins**, par une technique de marquage immunohistochimique des cellules endothéliales.

Par ailleurs, les paramètres de pharmacocinétique plasmatique du *tableau 13* tiennent compte uniquement de l'élimination de la molécule de PS initiale (non dégradée au niveau du peptide), TPC-Ahx-ATWLPPR. Or, la décroissance des taux de TPC-Ahx-ATWLPPR observée peut résulter non seulement d'une «vraie» élimination (transformation en métabolites non actifs, élimination par les reins, le foie etc.), mais également de la formation du produit de dégradation photoactivable TPC-Ahx-A. Par conséquent, les paramètres d'élimination déterminés **ne sont pas le témoin de l'élimination du compartiment sanguin de tous les composés photoactivables**. Nous travaillons en collaboration avec le Pr Etienne Chatelut (Institut Claudius-Regaud, Toulouse) afin de déterminer plus précisément les paramètres pharmacocinétiques liés à TPC-Ahx-ATWLPPR et à TPC-Ahx-A, au niveau de différents organes.



### IV.3.3 Optimisation des facteurs de la PDT : présentation de l'outil «plan d'expériences»

#### IV.3.3.1 Introduction

Toutes les thérapies nécessitent une estimation, même approximative, de la dose délivrée (*e.g.* quantité de médicament dans le cas de la chimiothérapie, dose de radiations dans le cas de la radiothérapie ou, dans un autre domaine, quantité de chaleur apportée dans le traitement des varices par laser endoveineux <sup>(449)</sup>), de façon à maximiser le rapport bénéfice/risque pour le patient. Une dose insuffisante ne permettra pas d'éradiquer la tumeur, et peut même stimuler sa croissance, par la sécrétion de facteurs de croissance <sup>(447, 450-454)</sup>, mais une dose trop élevée sera, quant à elle, toxique.

Dans le cas de la PDT, il existe une complexité accrue, du fait que les espèces cytotoxiques sont générées *in situ*, suite à l'interaction entre un **PS**, de la **lumière**, et l'**oxygène**. Par ailleurs, lors de l'initiation du traitement, il existe une hétérogénéité spatiale dans la tumeur du PS et de l'oxygène (du fait des différents degrés de vascularisation des différentes zones de la tumeur), ainsi que de la lumière (hétérogénéité des propriétés optiques des tissus, absorption lumineuse par les fluorophores endogènes et par le PS qui limite la pénétration de la lumière). Outre ces **variations spatiales**, il existe également des **variations temporelles** des différents facteurs durant le traitement. Les ERO générées peuvent détruire le PS (photoblanchiment) ; les dommages causés aux tissus peuvent induire des variations de leurs propriétés optiques ; la concentration en oxygène peut diminuer, du fait de sa consommation photochimique (hypoxie chronique) <sup>(455)</sup> ou de la destruction des vaisseaux sanguins (hypoxie aiguë), au cours de la PDT, ou au contraire augmenter (ce phénomène a en effet été rapporté dans la littérature <sup>(405)</sup> comme résultant d'une diminution de la consommation métabolique en oxygène des cellules tumorales suite aux dommages photoinduits).

L'absence de dosimétrie précise en PDT représente actuellement le principal frein à son essor, et la détermination d'une méthode de dosimétrie constitue une voie de recherche primordiale. La formule suivante fournit une expression simplifiée de la dose photodynamique, en se basant sur la dose d'oxygène singulet générée (adapté de <sup>(456)</sup>) :

$$\text{Dose photodynamique} \sim [\text{PS}] \times \varphi \times t \times \varepsilon \times [{}^3\text{O}_2] \times \Phi_{\Delta}$$

Où: PS est la quantité de PS présente dans les tissus (mol/L)

$\varphi$  est l'irradiance lumineuse ( $\text{W}/\text{cm}^2$ )

t est le temps d'irradiation (s)

$\varphi \times t$  est la fluence lumineuse ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )

$\varepsilon$  est le coefficient d'extinction molaire du PS à la longueur d'onde d'irradiation ( $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

$[{}^3\text{O}_2]$  est la concentration d'oxygène moléculaire présent dans les tissus (mol/L)

$\Phi_{\Delta}$  est le rendement quantique en oxygène singulet du PS

Cependant, seule une fraction, difficilement déterminable, de cette dose va effectivement servir à oxyder des sites intracellulaires critiques, et la dose photodynamique nécessaire pour aboutir à l'effet thérapeutique recherché peut varier selon le type tumoral. Par ailleurs, cette formule ne tient pas compte des variations spatiales et temporelles des différents facteurs de la PDT. L'implémentation de nouvelles méthodes, comme la dosimétrie implicite, pourrait permettre de suivre la délivrance de la dose en temps-réel, en se basant sur la luminescence de l'oxygène singulet<sup>(457, 458)</sup> ou le photoblanchiment du PS<sup>(459)</sup>, mais ces techniques sont encore en développement.

Ainsi, lors du développement d'un nouveau PS, il paraît actuellement difficile de trouver les conditions de PDT optimales par une simple escalade de doses, du fait de l'interaction entre les trois facteurs de la PDT : le PS présent dans les tissus, la lumière et l'oxygène. Si la dose générée s'avère trop faible, faudrait-il augmenter la dose de PS, celle de lumière ou les deux à la fois ?

Par ailleurs, l'expérimentateur ne peut pas agir directement sur ces facteurs, mais sur :

- **la Dose de PS administrée**, en mg/kg, qui influe sur la dose de PS présente dans les tissus au moment de l'irradiation ;
- **l'IDL**, en heures, qui agit sur la dose de PS présente dans les différents tissus et sur sa répartition entre cellules tumorales et vaisseaux sanguins ;
- **la Fluence lumineuse**, en  $\text{J}/\text{cm}^2$ , liée à la quantité totale de lumière (photons) apportée au cours du traitement ;

- **et, l'Irradiance** lumineuse, en  $\text{mW/cm}^2$ , c'est-à-dire la vitesse à laquelle cette lumière est appliquée.

Ces quatre facteurs vont interagir de manière complexe et influencer sur la quantité de PS, de lumière et d'oxygène présents, et permettre de moduler la réponse à la PDT.

Les **plans d'expériences** sont bien connus des chercheurs dans les domaines de l'agro-alimentaire et de la chimie, et sont très utiles dans des situations où de nombreux facteurs interviennent en modulant la réponse observée. Ils permettent, par exemple, de déterminer les conditions permettant de minimiser la croissance d'agents pathogènes <sup>(460, 461)</sup>, d'optimiser la formulation d'une molécule <sup>(462)</sup> ou les protocoles de combinaisons de traitements anticancéreux <sup>(463)</sup>, en réalisant un minimum d'expériences. Sur un plan cognitif, ils permettent de déterminer, par une méthode empirique, l'impact de chacun des facteurs considérés sur la réponse observée, et les interactions entre ces facteurs.

A notre connaissance, les plans d'expériences n'ont jamais été utilisés dans le domaine de la PDT, alors que son caractère multifactoriel et dynamique s'y prête fortement. Dans cette étude, nous avons évalué la faisabilité d'utiliser cette méthode pour optimiser les conditions de PDT *in vivo* avec TPC-Ahx-ATWLPPR, de façon à minimiser le nombre de souris à utiliser.

Cette partie du travail a nécessité l'expertise du Pr Michel Linder, du Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaires (Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires-Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSAIA-INPL), Nancy-Université).

### IV.3.3.2 Matériel et Méthodes

#### IV.3.3.2.1 Choix du type de matrice et analyse des résultats

Nous avons utilisé une Méthodologie des Surfaces de Réponses, avec une matrice de Doehlert <sup>(464)</sup>. Si  $k$  est le nombre de facteurs à tester, le nombre d'expériences à réaliser sera supérieur ou égal à  $k^2 + k + 1$ . La génération de la matrice et l'analyse des résultats est effectuée à l'aide du logiciel Nemrod-W® (LPRAI, Aix-en-Provence, France).

### IV.3.3.2.2 Facteurs et valeurs limites de ces facteurs

Si l'on testait chacun des 4 facteurs précédemment cités (dose de PS, IDL, fluence, irradiance), il faudrait réaliser  $4^2 + 4 + 1 = 21$  expériences, à réaliser en quintuplicats, soit un total de 105 souris, au minimum. Avec 3 facteurs, ce nombre est réduit à 65 souris.

Nous avons donc choisi de travailler à un IDL fixé à 4 heures, et l'optimisation a été faite sur les 3 autres facteurs : dose de PS, fluence et irradiance. Il était alors nécessaire de choisir les bornes (valeurs minimale et maximale) de chacun des facteurs. En fonction des données de la littérature, nous avons sélectionné des doses de PS comprises entre 0,70 et 2,80 mg/kg (ces doses sont les équivalents molaires de 0,3 et 1,2 mg/kg de Foscan®, respectivement). Ces valeurs correspondent à des concentrations sanguines, immédiatement après l'injection, de 5 et 20  $\mu\text{M}$ , respectivement, en TPC-Ahx-ATWLPPR (à comparer avec les concentrations utilisées *in vitro*, comprises entre 0,1 et 5  $\mu\text{M}$ ), pour un volume sanguin représentant 8 à 10% du poids de l'animal. De plus, une dose de 2,80 mg/kg est non toxique à l'obscurité, selon les études préalables de biodistribution tissulaire. Les bornes de fluence et d'irradiance ont été fixées à 10-150  $\text{J}/\text{cm}^2$  et 50-150  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , respectivement, en accord avec les valeurs couramment utilisées pour les PS (Tableau 7, page 46).

La matrice de Doehlert impose des niveaux de valeurs entre ces bornes, de 3, 5 et 7 pour les 3 facteurs. Nous avons choisi d'attribuer 3, 5 et 7 niveaux à la dose de PS, à l'irradiance et à la fluence, respectivement (Tableau 14).

**Tableau 14. Bornes (inférieure et supérieure), délimitant le domaine expérimental, et nombre de niveaux des trois facteurs du plan d'expériences.**

Facteur (unité)	Borne inférieure	Borne supérieure	Nombre de niveaux
Dose de PS (mg/kg)	0,70	2,80	3
Fluence ( $\text{J}/\text{cm}^2$ )	10	150	7
Irradiance ( $\text{mW}/\text{cm}^2$ )	50	150	5

### IV.3.3.2.3 Protocole de PDT

Lorsque le diamètre des tumeurs atteint  $5 \pm 1$  mm, la dose de TPC-Ahx-ATWLPPR imposée par le plan d'expériences est injectée aux souris (200  $\mu\text{L}/25$  g de poids corporel) par voie i.v., dans une veine latérale de la queue. La solution stock de PS, solubilisé dans le DMSO, est diluée dans un mélange de PEG 400 : éthanol : eau (3 : 2 : 5). Au bout de 4 heures (IDL), la souris est anesthésiée et la tumeur irradiée à l'aide d'un laser à colorant (SpectraPhysics 375B, Les Ulis, France), pompé par un laser argon (Spectra-Physics 2020), à

## Partie IV : Résultats

---

une longueur d'onde de 652 nm, avec un spot de 1 cm (afin de laisser une « marge de sécurité » d'environ 2 mm autour de la tumeur). La puissance en sortie de fibre ( $P(\text{mW}) = \text{irradiance} (\text{mW}/\text{cm}^2) \times 0,79 \text{ cm}^2$ ) est mesurée à l'aide d'un puissance-mètre, et le temps d'irradiation adapté de façon à avoir la fluence requise ( $t_{\text{irradiation}} (\text{s}) = \text{fluence} (\text{J}/\text{cm}^2) / \text{irradiance} (\text{mW}/\text{cm}^2) \times 1000$ ). Cinq souris par condition ont été utilisées.

### IV.3.3.2.4 Suivi de volume tumoral et modèle de croissance tumorale

Après PDT, le volume tumoral est mesuré 3 fois par semaine, à l'aide d'un pied à coulisse, selon deux axes, correspondant respectivement au plus grand «diamètre» ( $D$ , en mm) et au plus petit «diamètre», qui lui est perpendiculaire ( $d$ , en mm). Un troisième axe, correspondant à la profondeur de la tumeur, est parfois utilisé pour les calculs de volume tumoraux, mais sa mesure nous a semblé trop imprécise. Le volume tumoral ( $V$ , en  $\text{mm}^3$ ) est calculé selon la formule suivante :

$$V = (D \times d^2) / 2$$

En collaboration avec le Dr Thierry Bastogne (Centre de Recherche en Automatique de Nancy), les courbes de croissance ont été ajustées en utilisant un modèle hyperbolastique à 3 paramètres ( $V_\infty$ ,  $\beta$  et  $\theta$ )<sup>(465)</sup> :

$$V_t = \frac{V_\infty}{1 + \frac{V_\infty - V_0}{V_0} \cdot \exp[-V_\infty \beta t - \theta \cdot \text{arcsinh}(t)]}$$

où :  $t$  est le temps après PDT

$V_0$  est le volume tumoral au moment de la PDT

$V_t$  est le volume tumoral au temps  $t$  après PDT.

### IV.3.3.2.5 Choix des réponses

L'optimisation peut se faire en observant plusieurs réponses consécutives à la PDT. Puisque le but principal d'un traitement est de retarder la croissance tumorale à long terme, voire d'éradiquer la tumeur, nous avons choisi de travailler sur une étude de suivi de la croissance tumorale après PDT. Les réponses sélectionnées sont les ratios du volume tumoral

## Partie IV : Résultats

à 14, 21 et 28 jours sur le volume tumoral au moment de la PDT,  $V_0$  ( $V_{14}/V_0$ ,  $V_{21}/V_0$ ,  $V_{28}/V_0$ ). L'analyse a été faite sur les médianes de ces ratios.

### IV.3.3.3 Résultats et Discussion

#### IV.3.3.3.1 Matrice d'expériences

La matrice d'expériences générée par le logiciel Nemrod-W® est présentée dans le *tableau 15*.

Tableau 15. Matrice d'expériences.

N° exp.	Irradiance (mW/cm <sup>2</sup> )	Fluence (J/cm <sup>2</sup> )	Dose de PS (mg/kg)	Puiss. en sortie de fibre (mW)	Temps d'irradiation
1	150	80	1,75	117,8	8'53''
2	50	80	1,75	39,2	26'40''
3	125	150	1,75	98,2	20'
4	75	10	1,75	58,9	2'13''
5	125	10	1,75	98,2	1'20''
6	75	150	1,75	58,9	33'20''
7	125	103	2,80	98,2	13'44''
8	75	57	0,70	58,9	12'40''
9	125	57	0,70	98,2	7'36''
10	100	127	0,70	78,5	21'10''
11	75	103	2,80	58,9	22'53''
12	100	33	2,80	78,5	5'30''
13	100	80	1,75	78,5	13'20''

#### IV.3.3.3.2 Résultats du plan d'expériences

Le logiciel NemRod-W® utilise des **variables centrées réduites** (comprises entre -1 et 1) pour les différents facteurs, notées  $X_i$  [ $i=1$  (irradiance), 2 (fluence) ou 3 (dose de PS)], calculées à partir des valeurs «vraies»  $x_i$ , telles que celles présentées dans le *tableau 15*. On a la relation suivante :

$$X_i = \frac{2 \cdot x_i - x_{i,\max} - x_{i,\min}}{x_{i,\max} - x_{i,\min}}, \quad i=1,2,3$$

## Partie IV : Résultats

**Tableau 16. Correspondance entre les valeurs réduites (X) des facteurs irradiance, fluence et dose de PS, et leurs valeurs «vraies».**

X=	-1	-0,8	-0,6	-0,4	-0,2	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Irradiance ( $x_1$ , mW/cm <sup>2</sup> )	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Fluence ( $x_2$ , J/cm <sup>2</sup> )	10	24	38	52	66	80	94	108	122	136	150
Dose de PS ( $x_3$ , mg/kg)	0,70	0,91	1,12	1,33	1,54	1,75	1,96	2,17	2,38	2,59	2,80

A partir des réponses obtenues pour chacune des 13 conditions du *tableau 15*, le logiciel détermine les différents **coefficients de la formule suivante**, prédisant le ratio  $V_x/V_0$ , en fonction des  $X_i$  :

$$V_x/V_0 = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

$$= b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{22} X_2^2 + b_{33} X_3^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{23} X_2 X_3$$

Le coefficient  $b_0$  correspond au ratio  $V_x/V_0$  au centre du domaine expérimental ; les coefficients  $b_i$  quantifient l'influence de chacun des 3 facteurs testés sur le ratio  $V_x/V_0$ , donc sur la réponse à la PDT ; les termes quadratiques  $b_{ii}$  témoignent d'effets de courbure ; les coefficients  $b_{ij}$  reflètent l'influence de l'interaction entre 2 facteurs sur la réponse. Les différents coefficients obtenus sont présentés dans le *tableau 17*.

**Tableau 17. Coefficients du modèle quadratique pour les 3 variables : irradiance (entre 50 et 150 mW/cm<sup>2</sup>), fluence (de 10 à 150 J/cm<sup>2</sup>) et dose de PS (entre 0,70 et 2,80 mg/kg). Les réponses sont les ratios du volume tumoral à 14, 21 et 28 jours sur le volume tumoral au moment de la PDT. L'analyse a été faite sur les médianes de ces ratios (n=5).**

Terme	Signification	$V_{14}/V_0$	$V_{21}/V_0$	$V_{28}/V_0$
b0	$V_x/V_0$ au centre du domaine (condition 13 de la matrice d'expériences)	8,270	16,460	20,400
b1	Influence de l'irradiance sur la réponse $V_x/V_0$	0,630	1,213	2,021
b2	Influence de la fluence sur la réponse $V_x/V_0$	-1,201	-1,895	-2,916
b3	Influence de la dose de PS sur la réponse $V_x/V_0$	-0,561	-1,233	-2,762
b11	Terme quadratique (irradiance)	-3,170	-7,300	-5,335
b22	Terme quadratique (fluence)	-3,660	-8,313	-8,585
b33	Terme quadratique (dose de PS)	-3,415	-8,567	-9,952
b12	Interaction de l'irradiance et de la fluence	-1,230	-1,132	-0,745
b13	Interaction de l'irradiance et de la dose de PS	0,955	0,523	-0,227
b23	Interaction de la fluence et de la dose de PS	-1,754	-4,884	-9,571
$R^2$	Coefficient de détermination	0,611	0,684	0,797

**L'interaction entre la dose de PS et la fluence** a un poids plus important sur la croissance tumorale que l'irradiance, la fluence ou la dose de PS séparément (comparaison de la valeur absolue du coefficient  $b_{23}$  avec les valeurs absolues de  $b_1$ ,  $b_2$  et  $b_3$ , *tableau 17*). La fluence et la dose de PS interagissent donc fortement. Si une augmentation d'un seul de ces facteurs tend à ralentir la croissance tumorale (signe négatif de  $b_2$  et  $b_3$ ), leur augmentation simultanée conduit à une synergie permettant de diminuer la taille tumorale (signe négatif de  $b_{23}$ , avec une valeur absolue plus grande que celle de  $b_2$  et  $b_3$ ).

L'interaction entre dose de PS et fluence paraît assez logique, mais seule l'analyse qui suit, dans le paragraphe suivant, nous permet de déterminer les valeurs optimales de chacun des facteurs (*Figure 37*). Il faut cependant remarquer que les coefficients de détermination ( $R^2$ ) sont bas (*Tableau 17*) ; cela provient du caractère *in vivo* de l'étude, à l'origine d'importantes variations dans les réponses expérimentales observées. Le modèle ne permet donc pas d'estimer *a priori* de façon précise la réponse expérimentale à partir des valeurs des facteurs (irradiance, fluence et dose de PS). Une augmentation du nombre d'animaux utilisés pour chacune des 13 conditions pourrait permettre d'augmenter le coefficient de détermination du modèle. Cependant, cette étude ne prétend pas prédire de façon exacte le volume tumoral à partir des conditions expérimentales utilisées, ce qui paraît trop ambitieux pour une étude *in vivo*, mais simplement fournir une méthodologie de *screening* des facteurs expérimentaux de la PDT pour une réponse optimale à la PDT.

L'étude du **chemin optimal** est présentée sur la *figure 37*. Les courbes obtenues sont similaires pour toutes les réponses ( $V_{14}/V_0$ ,  $V_{21}/V_0$  et  $V_{28}/V_0$ ). D'après les trois graphes de gauche, une minimisation du volume tumoral est possible, en se plaçant sur la gauche de l'axe des abscisses (distance =1,00). D'après les graphes de droite de la *figure 37*, il existe un optimum de la valeur de **l'irradiance à 95 mW/cm<sup>2</sup>** (variable centrée réduite X à -0,1, à lire sur l'axe des ordonnées). Nous avons donc fixé la valeur de l'irradiance à 95 mW/cm<sup>2</sup> ; le graphe présentant les courbes d'isorréponses  $V_{14}/V_0$  en fonction des valeurs de dose de PS et de fluence est présenté sur la *figure 38*. Plusieurs couples (dose de PS ; fluence) aboutissent à la même réponse (en se déplaçant sur les courbes d'isorréponses). Nous avons sélectionné une valeur de **2,80 mg/kg pour la dose de PS** ( $X_3=1$ ), afin de conserver la dose de PS utilisée précédemment pour les études de biodistribution tissulaire, et une **fluence de 120 J/cm<sup>2</sup>** ( $X_2=0,6$ ). La réponse associée à ce couple est proche de  $V_{14}/V_0 = 1,000$ .



### IV.3.3.4 Conclusions

Nous avons utilisé une méthodologie de plan d'expériences afin d'optimiser (en terme de minimisation du volume tumoral) les conditions de PDT à appliquer, en réalisant un minimum d'expériences. Cette approche n'a, à notre connaissance, jamais été utilisée dans le domaine de la PDT. Les différents facteurs considérés varient **simultanément**, ce qui est plus approprié au domaine de la PDT (phénomène dynamique, avec de fortes interactions entre les facteurs) qu'une approche où les facteurs varient les uns après les autres, en maintenant les autres fixés à une valeur (arbitrairement choisie, qui plus est).

Nous avons ainsi sélectionné, avec un IDL de **4 heures**, une dose de PS de **2,80 mg/kg**, une irradiance de **95 mW/cm<sup>2</sup>** et une fluence de **120 J/cm<sup>2</sup>**.

## Partie IV : Résultats

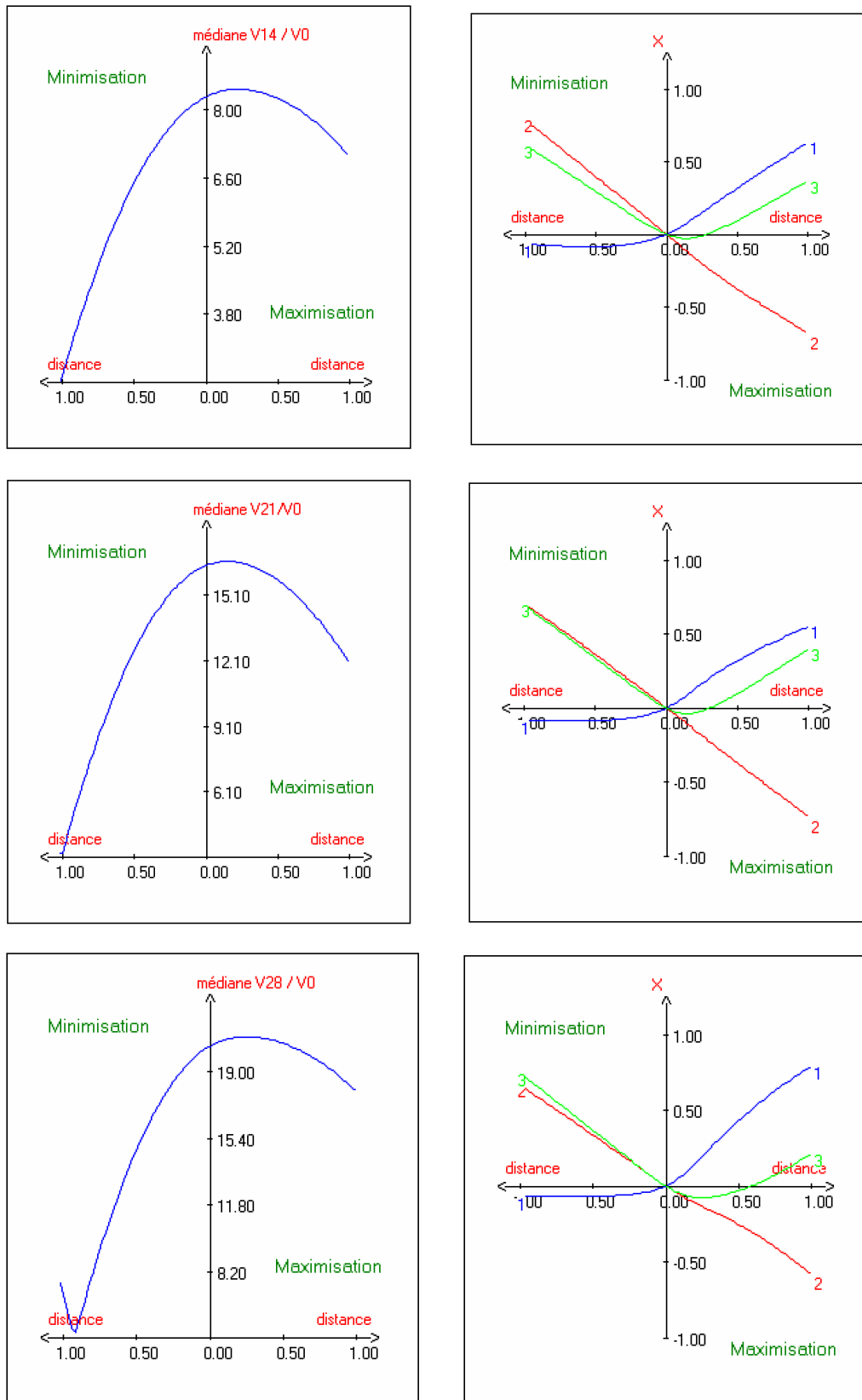


Figure 37. Etude du chemin optimal pour les réponses  $V_{14}/V_0$  (*haut*),  $V_{21}/V_0$  (*milieu*) et  $V_{28}/V_0$  (*bas*). Les graphes de gauche indiquent si une minimisation du volume tumoral est possible et précisent où se situer sur l'axe des abscisses dans cette optique. Les graphes de droite représentent l'évolution de chacun des facteurs (1 : irradiance, 2 : fluence, 3 : dose de PS) permettant d'obtenir cette minimisation du volume tumoral. Les valeurs correspondantes de ces facteurs, en variables centrées réduites, se lisent sur l'axe des ordonnées.

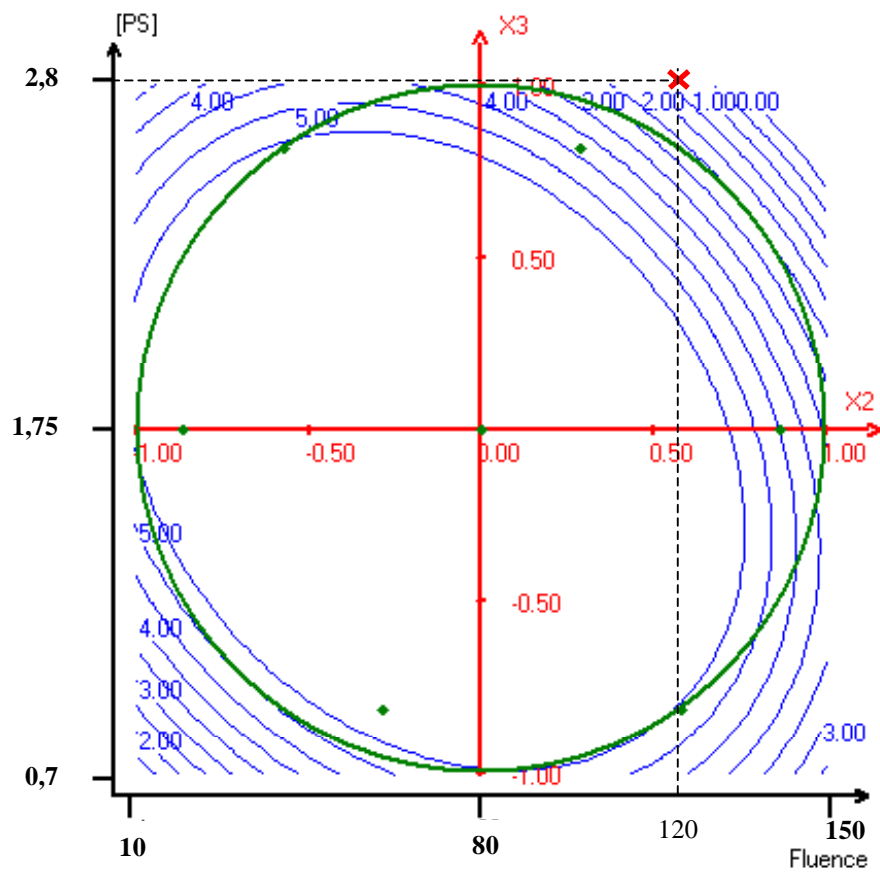


Figure 38. Courbes d'isoréponses de  $V_{14}/V_0$ , pour irradiance fixée à  $95 \text{ mW/cm}^2$ , en fonction des valeurs de dose de PS et de fluence. Le cercle vert délimite le domaine expérimental étudié.

### IV.3.4 Evaluation des effets de la PDT : comparaison de TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR

#### IV.3.4.1 Introduction

Afin de valider l'apport de la conjugaison de l'heptapeptide ATWLPPR à un PS sur l'efficacité *in vivo* de la PDT, nous avons effectué un **suivi de croissance tumorale** après PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR, dans les conditions optimales déterminées par les résultats du plan d'expériences. Afin d'examiner la réponse vasculaire suite à un traitement avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR, nous avons utilisé deux approches :

- un suivi de l'évolution du **flux sanguin pendant PDT**,
- et un **marquage des cellules endothéliales** 24 heures après PDT.

#### IV.3.4.2 Matériel et Méthodes

##### IV.3.4.2.1 Protocole de PDT

Le protocole de PDT est similaire à celui décrit précédemment (paragraphe IV.3.3.2.3., page 128), excepté que nous utilisons uniquement la condition déterminée par le plan d'expériences : IDL de 4 heures, fluence de 120 J/cm<sup>2</sup> et irradiance de 95 mW/cm<sup>2</sup>. La dose de PS retenue est de 2,80 mg/kg pour TPC-Ahx-ATWLPPR. En revanche, pour tenir compte des différences de masses molaires entre TPC et TPC-Ahx-ATWLPPR (661 et 1596 g/mol, respectivement), la dose de PS est de 1,16 mg/kg pour TPC, afin de pouvoir comparer les deux composés à quantité de molécules injectées égale. En fait, nous avons travaillé jusque-là en mg/kg, par conformité avec la littérature, mais cela est source de confusion, et il est plus judicieux de travailler en nombres de moles. La dose de PS retenue pour les 2 composés est donc de 1,75 μmol/kg (soit une concentration en PS dans la solution à injecter de 219 μM, dans les deux cas, pour un volume injecté de 200 μL/25 g de poids corporel).

Nous avons utilisé des souris différentes pour chacune des expériences de suivi du flux sanguin, d'immunohistochimie et de suivi de croissance tumorale.

### IV.3.4.2.2 Mesure du flux sanguin pendant PDT

L'appareil utilisé (système OxyFlo®, Oxford Optronix) traduit l'effet Doppler observé (décalage de longueur d'onde de la lumière) en une mesure du flux des globules rouges (produit de la concentration de ces cellules et de leur vitesse moyenne), représentant le flux sanguin microvasculaire (ou perfusion), exprimé en unités relatives (*Blood Perfusion Units*, BPU). Une variation de cette quantité peut refléter, soit une variation de la vitesse du flux sanguin, soit une variation de la quantité des érythrocytes.

Il existe plusieurs options de filtrage du signal, appelées : RAW (valeurs brutes du signal, avec un temps de réponse de 5 ms), BPU (lissage du signal ; temps de réponse de 200 ms) et ART (lissage du signal et élimination de certains artefacts tels qu'un coup au niveau de la table où se déroulent les mesures ; temps de réponse de 5 s). Des essais préliminaires nous ont permis de sélectionner la dernière option de traitement du signal.

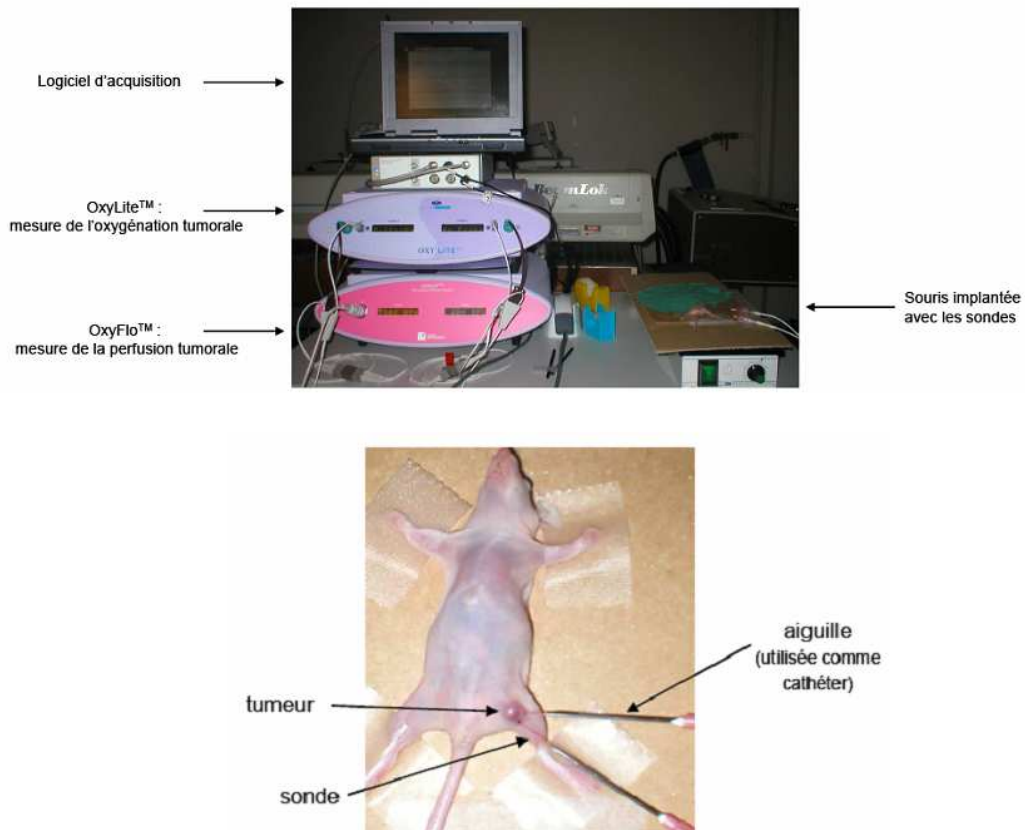
Les souris sont placées sur table thermostatée pendant toute la durée de la mesure. Une sonde est introduite dans la tumeur à l'aide d'une aiguille 18-gauge (Neolus 18G, Terumo Europe, Louvain, Belgique), utilisée comme manchon (*Figure 39*). Celle-ci est insérée dans la tumeur, puis légèrement rétractée, de manière à permettre la décompression des tissus, et l'extrémité de la fibre est placée au centre de la tumeur.

Une lumière de faible puissance ( $<0,5$  mW) est appliquée au moyen d'une diode laser intégrée au système. La longueur d'onde utilisée (830 nm) nous permet de suivre le flux sanguin avant, pendant et après PDT. Les sondes ont été précalibrées par le fournisseur à l'aide d'une suspension de billes de latex en mouvement brownien, et les paramètres correspondants sont rentrés dans l'appareil au début de l'expérience grâce à un système de code-barres.

Les mesures sont représentatives d'un volume de  $0,3-0,5$  mm<sup>3</sup> à proximité de la sonde et sont enregistrées pendant 5 min avant le début de la PDT, pendant la PDT et 10 min après. Les souris sont alors sacrifiées sans retirer la sonde de la tumeur, et la valeur de flux résiduel obtenue après stabilisation du signal est considérée comme le "zéro physiologique". Cette valeur est soustraite à l'ensemble des valeurs mesurées et les résultats sont présentés sous forme de pourcentage par rapport au flux avant PDT. Il n'est pas possible de comparer les valeurs de perfusion obtenues dans des tissus différents du fait de différences de leurs propriétés optiques.

## Partie IV : Résultats

Comme spécifié précédemment, il est possible de combiner l'OxyFlo® au système OxyLite® permettant une mesure de la pression partielle en oxygène avec la même sonde. Malheureusement, le caractère très hypoxique des tumeurs U87 ( $pO_2$  comprises entre 0,2 et 4 mmHg) ne nous a pas permis d'observer de variations de  $pO_2$  significatives entre le début et la fin de la PDT. En revanche, cela nous a permis de placer correctement la sonde dans la tumeur, de faibles valeurs de  $pO_2$  étant un témoin de bon positionnement dans la tumeur.



**Figure 39.** Dispositifs d'acquisition du système OxyLite®/ OxyFlo® (*haut*) et d'insertion des sondes dans la tumeur (*bas*).

### IV.3.4.2.3 Marquage des vaisseaux sanguins par immunohistochimie 24 heures après PDT

Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr François Plénat (Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU Brabois, Vandœuvre-lès-Nancy). Les vaisseaux issus des tissus murins ont été mis en évidence à l'aide de deux anticorps : **1)** le premier dirigé contre CD31 (ou PECAM-1, *Platelet/Endothelial Cell*

## Partie IV : Résultats

---

*Adhesion Molecule*), une glycoprotéine membranaire fortement exprimée par les cellules endothéliales (et, plus faiblement, par les plaquettes et certains leucocytes) et **2**) le second contre le collagène de type IV, un constituant des membranes basales vasculaires. Après essai de différentes solutions fixatrices, le fixateur retenu pour les tumeurs est une solution à base de zinc sans formaldéhyde (ce dernier masquant les épitopes de CD31, malgré diverses tentatives de démasquage de l'antigène selon plusieurs méthodes thermiques et/ou enzymatiques).

### • Préparation des échantillons

Les animaux sont sacrifiés 24 heures après PDT, et les tumeurs entières (d'un diamètre de  $5 \pm 1$  mm) sont immédiatement fixées dans le fixateur dont la composition est donnée dans le *tableau 18*. Il est important de noter que le pH de 7,4 indiqué correspond à la valeur obtenue pour la solution de Tris-HCl 0,1N seule, avant l'ajout des différents sels. Après cette addition, le pH diminue jusqu'à une valeur comprise entre 6 et 7, et il ne faut pas tenter de réajuster le pH, car cela conduit à une précipitation des sels, qui rendrait le tampon inefficace.

Tableau 18. Composition du fixateur.

Composé	Quantité pour 500 mL	Concentration finale
Tris (Trizma® base, Sigma)	6,055 g	0,1 N (pH 7,4)
HCl 1N	entre 50 et 100 mL	
Chlorure de zinc (Sigma)	2,501 g	36,7 mM
Acétate de zinc (Sigma)	2,502 g	22,8 mM
Acétate de calcium (Sigma)	0,253 g	3,2 mM
Eau stérile	Qsp. 500 mL	

Après une fixation de 18 à 24 heures à température ambiante, les tumeurs sont mises en cassettes puis déshydratées. La déshydratation est réalisée par passages dans des bains d'éthanol de concentration progressivement croissante (2 bains de 1 heure dans de l'éthanol 96° et 3 autres bains de même durée dans de l'éthanol à 100°). Les tumeurs sont ensuite imprégnées par un dissolvant de la paraffine (3 bains de 1 heure dans le toluène). Toutes ces étapes sont réalisées à température ambiante. Les échantillons sont alors placés dans un bain de paraffine à 60°C, pendant une nuit, puis déposés dans des moules remplis de paraffine fondue, le tout étant ensuite refroidi à l'air.

Des rubans de coupes tissulaires d'une épaisseur de 5  $\mu$ m sont réalisées à l'aide d'un microtome et trois à quatre images sont étalées à l'aide d'une goutte d'eau distillée sur des

## Partie IV : Résultats

---

lames de verre recouvertes de (D/L) polylysine (Polysine<sup>TM</sup>, Menzel-Gläser, Allemagne). Après élimination des plis au niveau des images, les lames sont placées sur une platine chauffante à 40-50°C pendant une nuit.

Les lames sont déparaffinées par immersion dans du toluène (8 min), puis progressivement réhydratées dans des bains d'éthanol de concentration décroissante (8 min à 100°, puis 8 min à 95°). Les lames sont alors rincées à l'eau distillée et placées dans un bac de PBST (PBS pH 7,4, 0,1% Tween 20) pendant 8 min, à température ambiante. L'utilisation du fixateur à base de sels de zinc permet de s'affranchir de l'étape de démasquage thermique des sites antigéniques le plus souvent indispensables après fixation formolique.

Les coupes sont encerclées à l'aide d'un stylo Dako Pen (DakoCytomation, Trappes, France), afin de délimiter deux zones sur la lame (une zone où la technique immunohistochimique est réalisée dans son intégralité et une autre zone où l'anticorps primaire est remplacé par une solution tampon, servant de témoin négatif).

Pour chacune des tumeurs, une coupe est colorée à l'hématoxyline éosine safran (HES). Les autres sont utilisées pour la mise en évidence successive sur les mêmes coupes de CD31 et du collagène IV, par technique de fluorescence, comme décrit ci-dessous.

- **Marquage des cellules endothéliales (CD31)**

L'anticorps monoclonal de rat (IgG<sub>2a</sub>, κ) anti-CD31 de souris (550274, BD Pharmingen) est dilué au 1/20<sup>ème</sup> dans un tampon dont la composition est la suivante : PBS pH 7,4 contenant 0,1% (m/v) azide de sodium, 0,06% (m/v) N-éthyl-maléimide, 1% (m/v) BSA, 30% (v/v) glycérol. L'incubation des coupes avec cet anticorps est réalisée en chambre humide pendant une nuit à 4°C.

A l'issue de ce temps d'incubation, les lames sont rincées par immersion dans un bain de PBST pendant 5 min. Nous avons ensuite utilisé un anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de rat biotinylé (3052-08, Clinisciences/Southern Biotech). La coupe est incubée avec cet anticorps dilué au 1/400<sup>ème</sup> dans du PBST pendant 1 heure à température ambiante, puis les



## Partie IV : Résultats

---

lames sont rincées à la pissette de PBST et par immersion dans un bac de TBST pH 7,6 (Tris-HCl 1M pH 7,6, NaCl 5M, Tween 0,1%).

La coupe est alors recouverte de streptavidine couplée à l'Alexa® 488 (Molecular Probes) diluée au 1/4000<sup>ème</sup> dans le TBST pH 7,6, pendant 1 heure à température ambiante. A partir de cette étape, un soin particulier est apporté afin de limiter toute exposition à la lumière, qui pourrait être à l'origine de phénomènes de photoblanchiment. Les lames sont rincées au TBST pH 7,6.

- **Marquage des membranes basales (collagène IV)**

Ensuite, un anticorps de lapin anti-collagène IV murin (Novatec, Lyon) est dilué au 1/3200<sup>ème</sup> dans le tampon de dilution de l'anticorps primaire, pour une incubation d'une nuit à 4°C. Les lames sont rincées par immersion dans un bac de TBST pH 7,6 pendant 5 min.

Les coupes sont ensuite recouvertes par un anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin biotinylé (E0432, Dakocytomation, Trappes), dilué au 1/200<sup>ème</sup> dans le TBST pH 7,6. Après une incubation de 1 heure à température ambiante, les coupes sont à nouveau rincées dans un bain de TBST pH 7,6.

Cette étape est suivie d'une incubation des coupes de 1 heure à température ambiante dans une solution au 1/4000<sup>ème</sup> dans du TBST pH 7,6 de streptavidine couplée au Texas Red® (Molecular Probes). Après un rinçage à la pissette de TBST pH 7,6, les coupes sont montées à l'aide d'un milieu aqueux (à base de PVA-glycérol) limitant le photoblanchiment.

- **Observation des lames**

Les préparations histologiques sont observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axioskope 2, Zeiss), équipé d'une platine motorisée et d'une caméra numérique rapide haute résolution (AxioCam HS) couplée au système d'acquisition et d'archivage d'image Axiovision 4,5. Cet ensemble permet l'obtention d'images numériques à haute résolution de la totalité d'un plan de coupe tumoral, et ceci tant en lumière ordinaire qu'en fluorescence.

L'examen des coupes après réalisation des techniques en fluorescence a été réalisé avec les réflecteurs suivants : excitation BP 455-495, dichroïque FT 500, émission BP 505-555 (**Alexa 488**) ou excitation : BP 540-552, dichroïque FT 550, émission BP 565-595 (**Texas Red**). Le logiciel permet également la fusion d'images multimodalités.

### *IV.3.4.2.4 Suivi de croissance tumorale après PDT*

Pour ces expériences, nous avons comparé un groupe de souris traitées par PDT avec TPC vs TPC-Ahx-ATWLPPR. Six souris ont été utilisées dans chaque groupe.

Après PDT, les tumeurs sont mesurées tous les 2 jours, et le volume tumoral est calculé comme décrit dans le paragraphe *IV.3.3.2.4*. (page 129). Pour comparer l'efficacité des différents traitements, nous avons utilisé l'analyse des courbes de survie de Kaplan-Meier, en utilisant le temps pour que le volume tumoral soit multiplié par 5 (ou par 10), comparativement au volume tumoral au moment de la PDT, comme paramètre de fin d'étude.

### **IV.3.4.3 Résultats et Discussion**

#### *IV.3.4.3.1 Suivi du flux sanguin pendant PDT*

Des courbes de suivi de flux sanguin microvasculaire et de température intratumorales pendant PDT avec TPC et avec TPC-Ahx-ATWLPPR (deux souris pour chaque cas) sont présentées sur les *figures 40* et *41*, respectivement. Dans le cas de TPC-Ahx-ATWLPPR, le flux sanguin augmente rapidement par rapport au niveau avant PDT (100%), jusqu'à une moyenne de 150% au bout de 2,5 min après le début de l'irradiation. Ensuite, le flux diminue progressivement jusqu'à une valeur plateau de 50%, environ (*Figure 41, courbes en bleu*). A l'inverse, chez les deux souris traitées par PDT avec TPC, dans les mêmes conditions de traitement, les valeurs du flux sanguin restent stables (*Figure 40, courbes en bleu*).

Les profils enregistrés avec TPC-Ahx-ATWLPPR sont comparables avec les profils obtenus pendant PDT avec du Photofrin® (dose de PS de 5 mg/kg, IDL de 24 heures, fluence de 135 J/cm<sup>2</sup>, irradiance de 5 mW/cm<sup>2</sup>), par une méthode de spectroscopie de corrélation diffuse<sup>(407, 409)</sup>. Les auteurs ont suggéré que l'augmentation initiale du flux pourrait être due à

une “autorégulation” du tissu. Celle-ci permettrait de compenser la consommation d’oxygène au cours des réactions photochimiques, au début de la PDT.

Une autre hypothèse est que cette augmentation de flux (*Figure 41, courbes en bleu*) serait due à l’augmentation de température pendant le traitement (*Figure 41, courbes en rouge*). Néanmoins, si cette hypothèse était vraie, on devrait observer une augmentation de flux similaire lors de la PDT avec TPC, dans les mêmes conditions de PDT, ce qui n’est pas le cas (*Figure 40*). Les valeurs de flux sont mêmes les plus stables chez la souris 2 (*Figure 40, droite*), pour laquelle les plus fortes variations de température sont enregistrées. Les valeurs plus élevées et le profil atypique de la courbe de température intratumorale chez cette souris, comparé aux trois autres, pourraient s’expliquer par un délai plus court entre l’injection du produit anesthésique et l’utilisation de la souris pour les mesures expérimentales. La température corporelle chez une souris est en effet de 37-38°C, mais cette température chute lorsque celle-ci est anesthésiée.

La diminution de flux sanguin qui s’ensuit lors du traitement avec TPC-Ahx-ATWLPPR, à des valeurs inférieures au niveau avant PDT (*Figure 41, courbes en bleu*), est en accord avec notre stratégie de ciblage des cellules endothéliales. En effet, cette diminution pourrait refléter la formation de thrombi, pouvant conduire à une occlusion vasculaire et à une diminution de la perfusion tumorale. Par conséquent, les événements initiateurs induits par la PDT pour chacun des PS semblent différents. La PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR induit des variations de flux vasculaire intratumoral très rapides durant le traitement, ce qui démontre un mode d’action premier de ce PS, et non de TPC, au niveau des vaisseaux tumoraux.

## Partie IV : Résultats

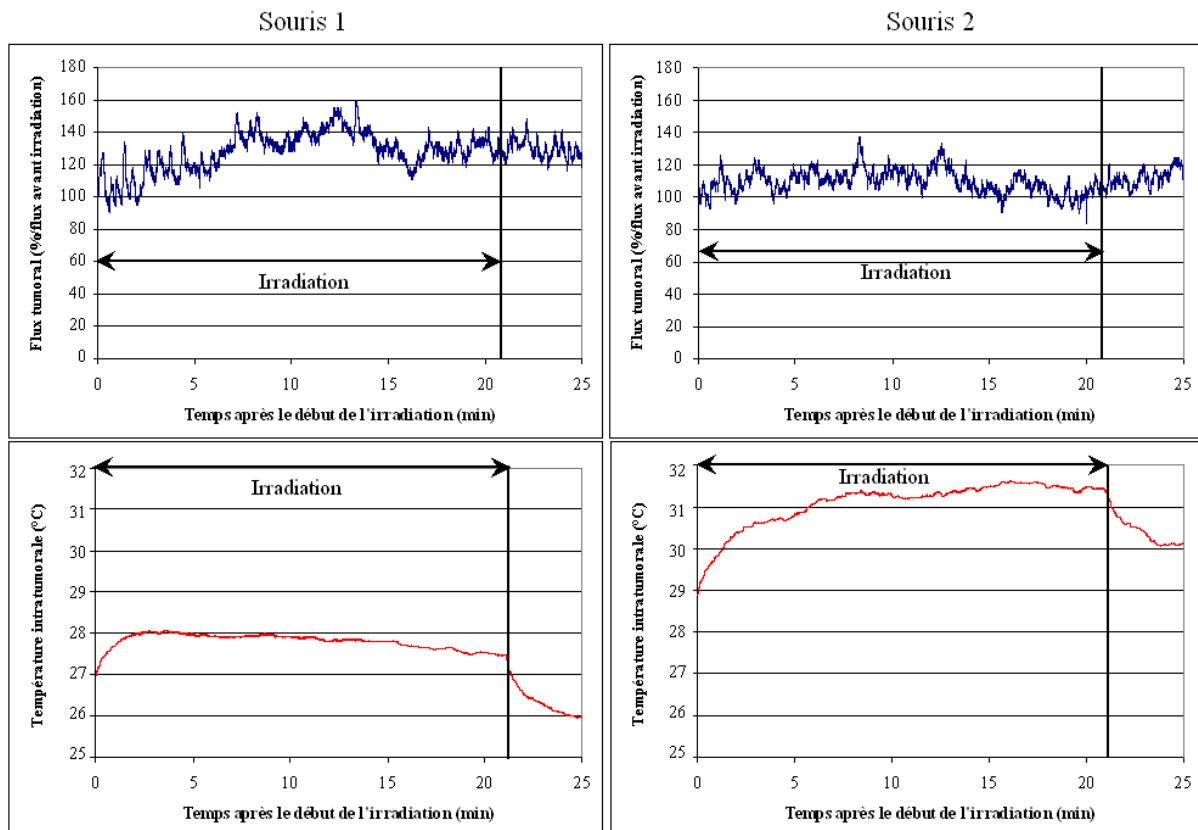


Figure 40. Variations du **flux** (relativement au niveau avant PDT) (*haut*) et de la **température** (*bas*) intratumorales chez deux souris (*gauche* et *droite*), pendant et après PDT avec TPC. Le trait vertical indique la fin de l'irradiation.

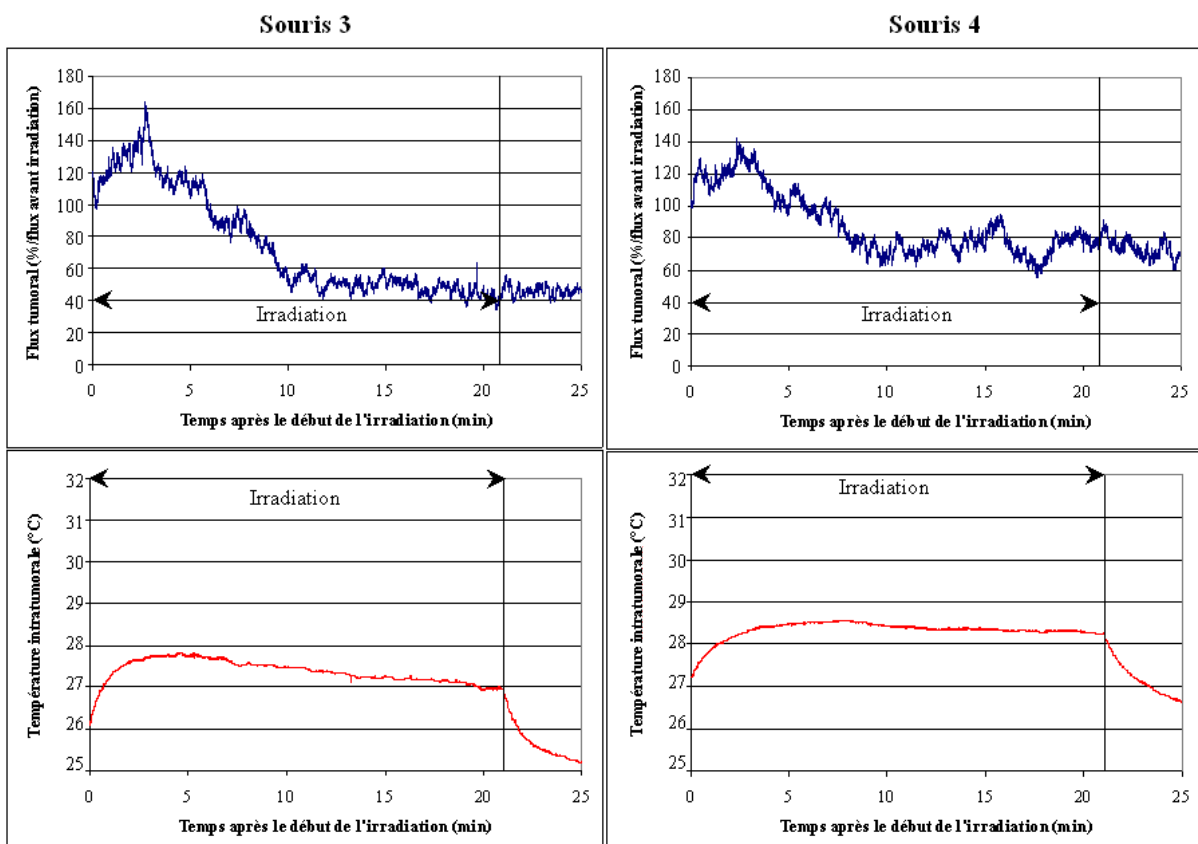


Figure 41. Variations du **flux** (relativement au niveau avant PDT) (*haut*) et de la **température** (*bas*) intratumorales chez deux souris (*gauche* et *droite*), pendant et après PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR. Le trait vertical indique la fin de l'irradiation.

### IV.3.4.3.2 Impact de la PDT sur les vaisseaux sanguins

Le lit vasculaire microcirculatoire de tumeurs U87 non traitées par PDT est constitué de vaisseaux irréguliers dont les cellules endothéliales sont bien visibles. L'examen des coupes en fluorescence après fusion des signaux correspondant aux cellules endothéliales et au collagène IV montre que ces deux éléments structuraux sont strictement colocalisés ; tous les vaisseaux tumoraux sont pourvus d'une membrane basale (*Figure 42a*).

Suite au traitement photodynamique, une majorité des cellules endothéliales vasculaires au sein de la tumeur disparaissent, que le PS utilisé soit TPC (*Figure 42b, gauche*) ou TPC-Ahx-ATWLPPR (*Figure 42c, gauche*). Nous avons vérifié, sur des coupes dont le collagène IV a été marqué par méthode enzymatique (avec contre-coloration à l'hématoxyline), que l'absence de marquage de CD31 après PDT (avec TPC et avec TPC-Ahx-ATWLPPR) ne résultait pas d'une simple altération de l'épitope, mais bien d'une disparition des cellules endothéliales (diminution du nombre de noyaux visibles au pourtour des vaisseaux sanguins, comparé à une tumeur non traitée). CD31 est toujours présent après PDT avec TPC et avec TPC-Ahx-ATWLPPR en périphérie de la tumeur, et se traduit par une « couronne » verte sur les images de microscopie de fluorescence (*Figure 42b&c, gauche*). Ce marquage pourrait refléter la persistance de cellules endothéliales au pourtour de la tumeur, mais peut aussi résulter d'un marquage non spécifique d'éléments, autres que des cellules endothéliales, présents au niveau de la capsule tumorale, qui restent à identifier. Les lames basales, en revanche, sont présentes, mais le marquage semble moins intense sur les coupes de tumeurs traitées par PDT avec TPC (*Figure 42b, milieu*) qu'avec TPC-Ahx-ATWLPPR (*Figure 42c, milieu*).

Suite au traitement par PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR, les cellules tumorales sont dissociées par de l'œdème et un fort pourcentage de ces cellules présentent des signes de mort par apoptose et/ou nécrose (noyaux condensés) (*Figure 43b&c*). Il n'a pas été observé de thrombose luminale. Les coupes de tumeurs traitées par PDT avec TPC, colorées en HES, ne présentent pas de différences morphologiques évidentes avec celles traitées par PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR.

Or, nous avons mis en évidence une différence importante de la variation du flux sanguin pendant PDT, selon que les tumeurs sont traitées par PDT avec TPC ou avec TPC-

Ahx-ATWLPPR. Puisque la cible moléculaire de TPC-Ahx-ATWLPPR (NRP-1) est située essentiellement au niveau des cellules endothéliales, l'événement initiateur supposé de la diminution du flux sanguin est une altération de ces cellules, conduisant à une perte de leurs jonctions intercellulaires (et donc à une augmentation de la perméabilité vasculaire) et, éventuellement, à une thrombose vasculaire. Cependant, TPC ne présente *a priori* pas d'affinité particulière pour les cellules endothéliales et n'induit pas de variations de flux sanguin significatives pendant PDT. Il peut donc paraître surprenant de ne pas observer ici de différence significative entre les deux traitements en terme de marquage des cellules endothéliales après PDT.

Le temps de 24 heures après traitement pour la récupération des tumeurs a été choisi en accord avec la littérature <sup>(466, 467)</sup>, et de façon à pouvoir observer des changements morphologiques au niveau des cellules tumorales, qui n'auraient pu l'être à des temps plus courts après PDT. Néanmoins, des temps plus courts (*e.g.* 4 heures) après traitement ont également été utilisés dans la littérature pour le marquage des cellules endothéliales après PDT <sup>(345, 468)</sup>. De tels temps pourraient être plus appropriés à l'observation de différences notables de marquage des cellules endothéliales entre PDT avec TPC *vs* TPC-Ahx-ATWLPPR, et à l'observation d'une éventuelle thrombose vasculaire <sup>(468)</sup>, d'autant plus que certains thrombi peuvent être instables et évacués dans la circulation sanguine <sup>(331)</sup>.

Une hypothèse permettant d'expliquer l'absence de marquage des cellules endothéliales 24 heures après PDT avec TPC est que celles-ci seraient altérées, non directement au cours de la PDT, mais plus tard, par un mécanisme indirect. Le faible marquage du collagène IV, qui est à confirmer, sur les coupes de tumeurs traitées par PDT avec TPC, comparé à TPC-Ahx-ATWLPPR, pourrait valider cette hypothèse. On peut penser qu'au moment de la PDT (4 heures après injection du PS), TPC serait situé en périphérie des vaisseaux sanguins, ce qui doit être vérifié sur coupes histologiques (voir paragraphe **IV.3.2.4.**, page 123). Cette localisation pourrait être à l'origine de dommages initiaux au niveau des membranes basales des vaisseaux et/ou des cellules tumorales à proximité et des dommages indirects aux cellules endothéliales pourraient ensuite être causés, par un mécanisme restant à élucider.

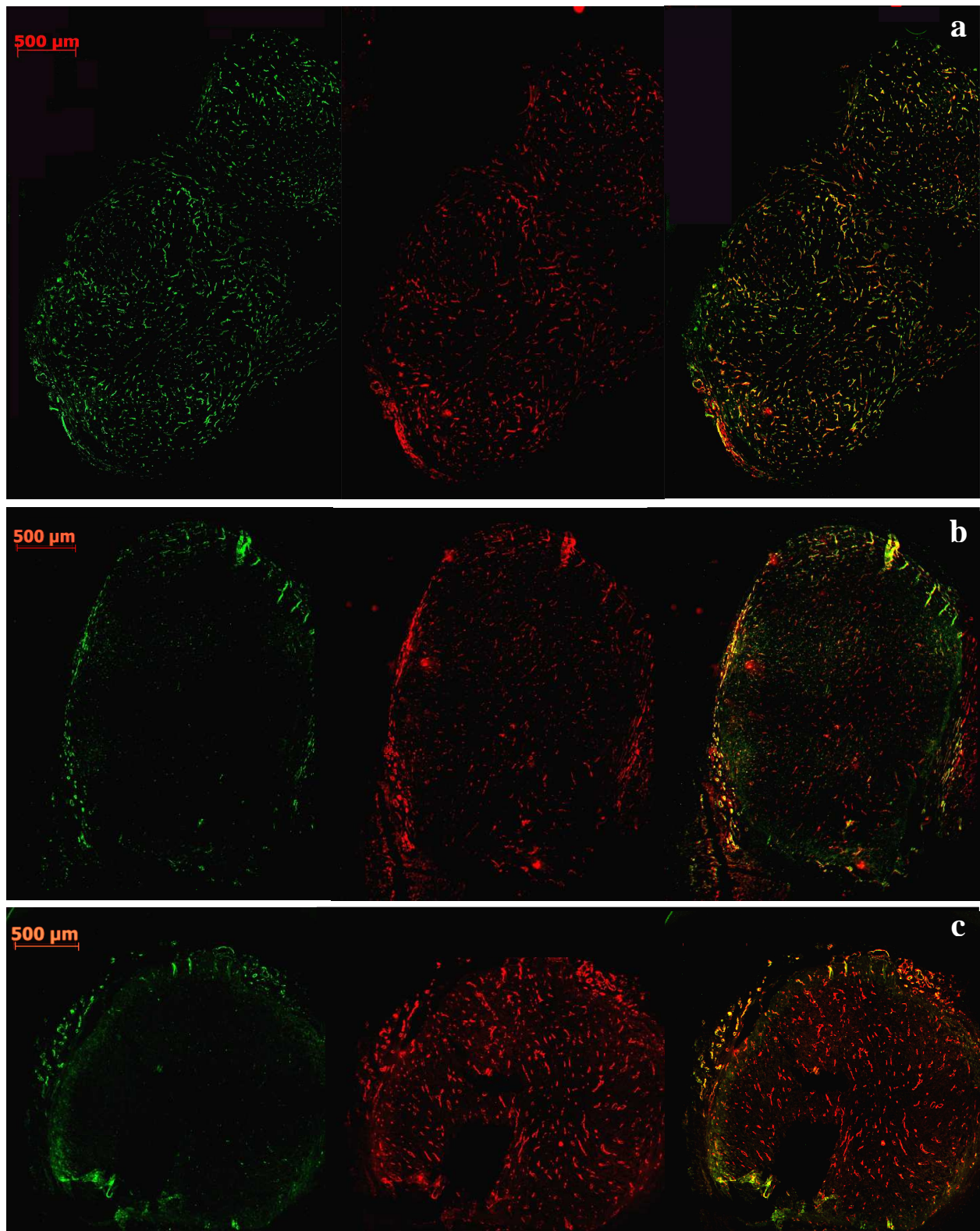


Figure 42. Marquage immunohistochimique des vaisseaux d'une tumeur U87 témoin, non traitée (a), et de tumeurs U87 traitées par PDT avec TPC (b) ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR (c), 24h après traitement. A gauche, en vert : Marquage CD31 des cellules endothéliales vasculaires. Au milieu, en rouge : Marquage collagène IV des membranes basales des vaisseaux. A droite : Fusion des deux images précédentes.



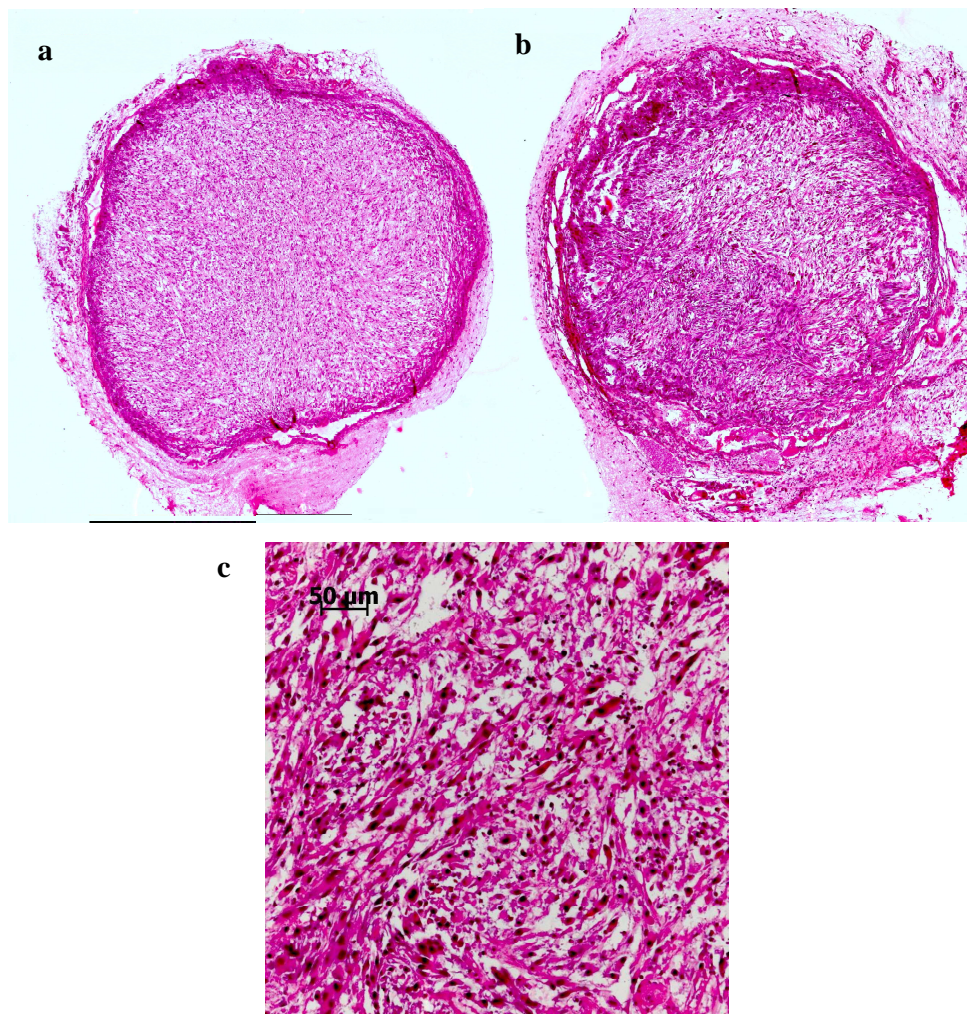


Figure 43. Colorations HES d'une tumeur U87 témoin, non traitée (a) et d'une tumeur U87 traitée par PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR (b), 24h après traitement. (c) Grossissement du centre de la tumeur traitée par PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR.



IV.3.4.3.3 Suivi de la croissance tumorale après PDT

Afin d'évaluer l'action anti-tumorale des traitements PDT avec TPC et avec TPC-Ahx-ATWLPPR, nous avons suivi l'évolution du volume tumoral médian (Figure 44).

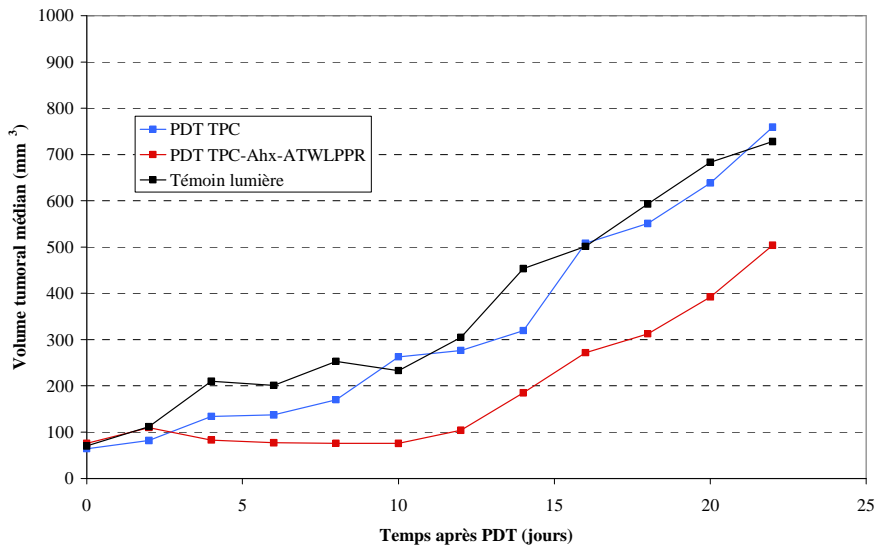


Figure 44. Evolution du volume tumoral médian des tumeurs U87 xénogreffées chez la souris *nude*, après PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR (dose de PS : 1,75  $\mu\text{mol/kg}$ , IDL : 4h, fluence : 120  $\text{J/cm}^2$ , irradiance : 95  $\text{mW/cm}^2$ ). Groupe témoin : souris ayant reçu le diluant et irradiées (témoin lumière). Six souris par groupe ont été utilisées.

La PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR induit un retard de croissance des tumeurs. Dans ce groupe, l'augmentation initiale apparente du volume tumoral, suivie d'une diminution de celui-ci, traduit en fait l'apparition d'un œdème, juste après (24 à 48 heures) traitement, qui n'est pas observé dans les autres groupes. On observe un arrêt de la prolifération tumorale pendant environ 10 jours après la PDT, puis une recroissance tumorale. L'ensemble de ces phénomènes n'est pas observé après PDT avec TPC, groupe pour lequel la croissance tumorale n'est pas visiblement différente de celle du groupe témoin (Figure 44).

Nous n'avons observé aucune cure tumorale, même avec le traitement le plus efficace, à base de TPC-Ahx-ATWLPPR. Un phénomène de reprise de croissance tumorale, à partir de cellules viables en périphérie de tumeurs, a également été observé dans une autre stratégie de ciblage vasculaire en PDT<sup>(331)</sup>.

Pour comparer l'efficacité de la PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR à celle de la PDT avec TPC, nous avons tracé les courbes de survie de Kaplan-Meier, en utilisant le temps pour

## Partie IV : Résultats

que le volume tumoral soit multiplié par 5 ou par 10, comparativement au volume tumoral au moment de la PDT ( $V/V_0 = 5$  ou  $10$ ), comme paramètre de fin d'étude (Figure 45). La différence entre PDT avec TPC vs TPC-Ahx-ATWLPPR est statistiquement significative lorsque le paramètre de fin d'étude considéré est  $V/V_0 = 5$  ( $p = 0,0039$ ) ou  $V/V_0 = 10$  ( $p = 0,0664$ ). La croissance tumorale du groupe traité par PDT avec TPC n'est pas statistiquement différente de celle du groupe témoin ( $p = 0,4149$  et  $p = 0,9860$ , pour  $V/V_0 = 5$  et  $10$ , respectivement).

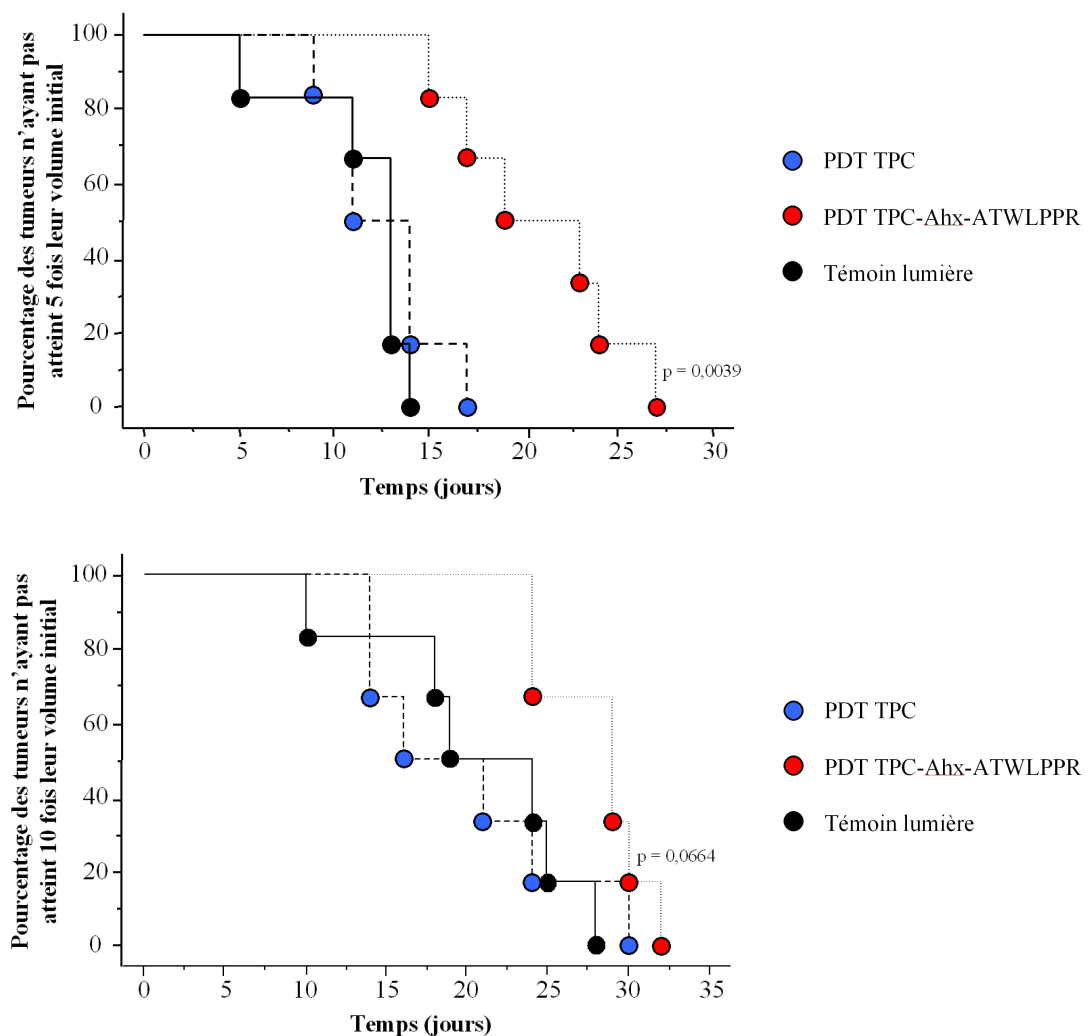


Figure 45. Représentations de Kaplan-Meier de la croissance tumorale des tumeurs U87 après PDT avec TPC ou avec TPC-Ahx-ATWLPPR (dose de PS :  $1,75 \mu\text{mol/kg}$ , IDL : 4h, fluence :  $120 \text{ J/cm}^2$ , irradiancance :  $95 \text{ mW/cm}^2$ ). Paramètre de fin d'étude :  $V/V_0 = 5$  (haut) ou  $V/V_0 = 10$  (bas). Groupe témoin : souris ayant reçu le diluant et irradiées (témoin lumière). Six souris par groupe ont été utilisées. L'analyse statistique a été réalisée en appliquant le *Log-rank test*. La valeur de p est celle obtenue en comparant les groupes PDT TPC vs PDT TPC-Ahx-ATWLPPR.

### IV.3.4.4 Conclusions

Le flux sanguin intratumoral augmente pendant les premières minutes de la PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR, puis diminue jusqu'à environ 50% de sa valeur avant le début de l'irradiation. A l'opposé, le flux sanguin intratumoral est stable pendant la PDT avec TPC. Ces résultats valident une **action anti-vasculaire de TPC-Ahx-ATWLPPR, apportée par la présence du peptide**, puisque aucun effet immédiat au niveau des vaisseaux n'est observé lors de la PDT avec TPC.

Les **cellules endothéliales** des vaisseaux sanguins sont **détruites** 24 heures après PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR, mais également avec TPC. Si TPC n'est pas à l'origine d'un effet anti-vasculaire immédiat, il semble induire, de façon indirecte, une destruction des cellules endothéliales. Des expériences de localisation intratumorale de TPC *vs* TPC-Ahx-ATWLPPR, 4 heures p.i., par microscopie de fluorescence (voir paragraphe **IV.3.2.4.**, page 123), pourraient apporter des éléments de réponse à l'explication de ce phénomène. De plus, la récupération des tumeurs à des temps plus courts après PDT pourrait permettre la mise en évidence de différences entre les traitements avec chacune des molécules, en terme d'apparition de thrombose et de marquage des cellules endothéliales.

La PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR induit un **ralentissement statistiquement significatif de la croissance tumorale**, comparé à la PDT avec TPC.

### IV.4 ETUDE DE STABILITE *IN VITRO* ET *IN VIVO*

L'attractivité des peptides pour des utilisations en PDT repose notamment sur leur petite taille, qui facilite la diffusion dans les tissus, et sur leur facilité de synthèse. Nous avons récemment répertorié dans une revue les diverses applications des peptides dans le domaine de la PDT <sup>(274)</sup>. Cependant, un des inconvénients majeurs liés à l'utilisation des peptides repose sur leur **manque de stabilité** *in vitro* et *in vivo*, pouvant compromettre notre stratégie de ciblage. En effet, le plasma contient des peptidases (ou protéases), enzymes protéolytiques de type hydrolase qui dégradent les chaînes peptidiques depuis le N- ou le C-terminal (exopeptidases, appelées aminopeptidases et carboxypeptidases, respectivement) ou qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes entre deux acides aminés (endopeptidases).

Nous avons montré que la portion peptidique de TPC-Ahx-ATWLPPR est **stable** pendant au moins 24 heures lors d'une incubation *in vitro* dans du **plasma humain et murin, à 37°C**.

Par opposition, une analyse par HPLC a révélé l'apparition *in vivo* d'un **produit de dégradation photoactivable**, dans le **plasma de la souris nude**, à partir de 2 heures p.i., mais à des taux relativement faibles jusqu'à 4 heures p.i. (<20% de la quantité circulante). La dégradation est, au contraire, très rapide dans les organes du système réticulo-endothélial (**foie** et rate). Le PS s'accumule à de très forts taux dans ces organes. Nous avons identifié **TPC-Ahx-A** comme étant le principal produit de dégradation formé, par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Les cellules endothéliales représentent la cible du PS conjugué. TPC-Ahx-ATWLPPR est **stable** dans le **milieu de culture** de ces cellules pendant au moins 24 heures à 37°C, mais **dégradé après incorporation intracellulaire**, principalement en TPC-Ahx-A, mais aussi en TPC-Ahx-AT et TPC-Ahx-ATWLPP. Ceci n'est pas préjudiciable à notre stratégie, puisque le peptide a déjà joué son rôle de molécule ciblante, et que, à ce stade, seule la partie PS est importante pour l'effet phototoxique. Une étude de colocalisation par microscopie confocale nous a permis de mettre en évidence une localisation principale du PS au niveau des **lysosomes** (collaboration avec le Dr Dominique Dumas, Laboratoire d'Energétique et de

## Partie IV : Résultats

---

Mécanique Théorique et Appliquée (LEMTA), Nancy-Université). L'addition dans le milieu de culture cellulaire d'un **inhibiteur d'enzymes lysosomales** inhibe significativement la proportion de PS dégradé en intracellulaire, démontrant l'implication des peptidases lysosomales dans la dégradation intracellulaire du PS.

L'identification des sites de dégradation au niveau du peptide, réalisée dans cette étude, peut permettre d'améliorer notre composé par l'élaboration de **pseudo-peptides** plus stables. Cette étude a été soumise pour publication <sup>(432)</sup>, actuellement sous correction, et est présentée dans les pages suivantes sous forme d'article.



















## V SYNTHÈSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

L'effet anti-vasculaire joue un rôle crucial dans l'éradication tumorale par PDT. Cet effet peut être favorisé en modifiant le protocole de PDT (diminution de l'IDL, principalement) ou en utilisant des PS à action anti-vasculaire (présentant une localisation préférentiellement plasmatique et/ou endothéliale). En particulier, les dommages photoinduits au niveau de l'endothélium vasculaire semblent être le principal événement initiateur de l'effet anti-vasculaire de la PDT. Or, les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins tumoraux présentent des marqueurs moléculaires spécifiques, comme les récepteurs au VEGF, qu'il est possible de cibler.

La **première partie** de ce travail de thèse a consisté à coupler un heptapeptide spécifique de la NRP-1, co-récepteur du VEGF, à un PS de type chlorure, et à effectuer les caractérisations chimiques et photophysiques de ce PS conjugué.

Nous avons démontré la faisabilité de coupler un peptide à un PS sur support solide. La méthode de purification par HPLC que nous avons développée permet l'obtention du PS conjugué avec une haute pureté. Le PS conjugué obtenu est relativement hydrophobe, mais moins que le PS non conjugué. De plus, le couplage au peptide ne modifie pas notablement les caractéristiques photophysiques du PS.

Dans une **deuxième partie**, une étude *in vitro* a été réalisée, sur cellules endothéliales de type HUVEC exprimant NRP-1.

Une étude comparative avec le PS non conjugué a montré pour le PS conjugué une cytotoxicité à l'obscurité moindre, une amélioration de l'incorporation intracellulaire et une activité photodynamique supérieure. Nous avons montré que l'incorporation cellulaire du PS conjugué résultait de mécanismes non spécifiques, mais surtout d'une affinité de la portion peptidique pour NRP-1, et non pour VEGFR-2/KDR, contrairement à ce qui était rapporté jusqu'alors dans la littérature, et donc à ce que nous croyions lorsque nous avons initié ce travail.

La **troisième partie** de ce travail correspond à l'étude *in vivo* du PS conjugué chez la souris *nude* xénotransgénée en ectopique par un modèle de gliome malin humain (U87).

Tout d'abord, nous nous sommes attachés à caractériser ce modèle en terme d'expression de NRP-1 et de VEGF diffusible. En particulier, les taux de VEGF circulants *in*

## Partie V : Synthèse générale des résultats

---

*in vivo* sont suffisamment bas pour que le VEGF<sub>165</sub> présent n'entre pas en compétition avec le PS conjugué pour la reconnaissance de la NRP-1.

Ensuite, nous avons étudié la pharmacocinétique plasmatique du PS conjugué et sa biodistribution, suite à une injection i.v. Celui-ci est éliminé du compartiment plasmatique plus rapidement que le Foscan® et est retrouvé dans la tumeur à des taux supérieurs à ceux de la peau et supérieurs aux taux intratumoraux de Foscan® décrits dans la littérature.

Les conditions de PDT (dose de PS, fluence, irradiance) ont été optimisées, en terme de minimisation du volume tumoral, par une approche originale, nouvelle dans le domaine de la PDT, utilisant les plans d'expériences. Cette méthode permet une optimisation des conditions de traitement en faisant varier les différents facteurs de la PDT simultanément, et en réalisant un minimum d'expériences.

Avec la condition de PDT optimale déterminée par le plan d'expériences, le traitement avec TPC-Ahx-ATWLPPR, et non celui avec TPC, induit des variations de flux sanguin pendant PDT, mettant en évidence l'action anti-vasculaire de TPC-Ahx-ATWLPPR apportée par le greffage du peptide. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins tumoraux sont détruites 24 heures après PDT, dans les deux cas ; la récupération des tumeurs à des temps plus courts après PDT pourrait permettre la mise en évidence de différences entre les PDT utilisant chacune des deux molécules. De plus, la PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR induit un ralentissement statistiquement significatif de la croissance tumorale, comparé à la PDT avec TPC.

Les peptides peuvent être dégradés *in vivo* par des peptidases, ce qui diminuerait fortement la sélectivité du PS conjugué pour les néovaisseaux. Dans une **quatrième partie**, une étude de stabilité *in vivo* et *in vitro* du PS conjugué a été réalisée.

Si la portion peptidique du PS conjugué est stable dans du plasma *in vitro*, elle est progressivement dégradée *in vivo*, chez la souris, au niveau de la liaison peptidique située entre les résidus alanine et thréonine. Cette dégradation a principalement lieu dans le foie, où le PS conjugué s'accumule à des taux élevés.

De même, le PS conjugué est stable dans le milieu de culture des cellules endothéliales, mais dégradé après incorporation intracellulaire, par des peptidases lysosomales.

## VI CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse s'inscrit dans un nouveau mode de traitement photodynamique, la **VTP (Vascular Targeted PDT)**. Il ne s'agit pas ici d'avoir un effet de mort directe des cellules tumorales, mais d'éradiquer la tumeur en visant les vaisseaux sanguins qui lui sont associés. Très peu d'études ont utilisé des peptides afin de permettre un ciblage des vaisseaux sanguins tumoraux dans le domaine de la PDT<sup>(346, 351, 440)</sup>. A notre connaissance, une seule équipe a évalué le potentiel anti-vasculaire de tels PS conjugués *in vivo*, dans le domaine du cancer<sup>(346)</sup>, mais la cible moléculaire sur les cellules endothéliales du peptide utilisé (APRPG) est inconnue.

Cette étude a mené depuis le **couplage** d'un PS à un peptide spécifique de la NRP-1 et les **caractérisations** chimiques et photophysiques de ce composé, jusqu'aux **études *in vitro*** sur HUVEC et ***in vivo***, sur souris *nude* porteuses de gliome malin humain. La plupart des techniques qui ont été utilisées n'existaient pas au laboratoire et ont été développées au cours de ce travail. Du fait du temps qu'a nécessité leur optimisation, certains des résultats obtenus *in vivo*, rapportés dans le présent document, doivent être confirmés sur un plus grand nombre d'animaux. Le **marquage des vaisseaux sanguins après PDT par technique immunohistochimique** sur des tumeurs récupérées à des temps courts après PDT (TPC-Ahx-ATWLPPR vs TPC) devra être réalisé. Il serait également intéressant d'estimer une éventuelle augmentation de la **perméabilité vasculaire** suite à la PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR vs TPC<sup>(331)</sup>.

Un point essentiel de cette étude a été le **choix de conditions de PDT *in vivo***. Malgré son caractère prometteur, la PDT reste encore peu développée en clinique en Europe, notamment du fait de la difficulté à déterminer les conditions de traitement optimales à l'aide d'une dosimétrie appropriée<sup>(300)</sup>. Actuellement, les doses de PS et de lumière utilisées sont celles basées sur les premières publications mais, à notre connaissance, aucun travail ne relate une détermination scientifique de ces facteurs. L'utilisation d'un **plan d'expériences** nous a permis de déterminer les valeurs de dose de PS à injecter, de fluence et d'irradiance lumineuses, permettant de minimiser le volume tumoral.



Les études de biodistribution tumorale ne fournissent pas nécessairement un IDL correspondant à une efficacité optimale. En effet, si un IDL de 96 heures, correspondant au maximum de concentration intratumorale en PS, a initialement été sélectionné pour les études précliniques et cliniques utilisant le Foscan®, de nombreuses études ont par la suite montré que des IDL plus courts conduisaient à une meilleure efficacité<sup>(337, 338, 343)</sup>. L'IDL de 4h retenu pour nos expériences *in vivo* a été déterminé en fonction des résultats de biodistribution tissulaire, de pharmacocinétique plasmatique et de stabilité *in vivo*. Cependant, il serait plus judicieux de se baser sur une cinétique d'incorporation du PS dans les cellules endothéliales *in vivo*, dans le but de favoriser l'effet anti-vasculaire recherché. Une technique immunohistochimique de localisation intratumorale du PS par **colocalisation avec les cellules endothéliales**, actuellement en cours d'optimisation, devrait nous permettre de sélectionner dans le futur un IDL optimal.

Si l'effet anti-vasculaire de la PDT peut parfois conduire à lui seul à une cure tumorale, il peut dans d'autres cas être insuffisant, d'autant plus si la dosimétrie n'a pas été optimale et s'il reste des cellules cancéreuses viables après PDT. L'hypoxie générée au sein de la tumeur du fait de la destruction des néovaisseaux peut, pour des doses de PDT sous-curatives, conduire à des phénomènes de ré-angiogenèse après PDT, suite à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, COX-2, ou les MMPs<sup>(447, 450-454)</sup>. Cela peut conduire à une reprise tumorale, mais également à l'apparition de métastases<sup>(469)</sup>. Des **combinaisons avec d'autres traitements** pourraient permettre d'améliorer l'efficacité de la PDT.

Une **première stratégie** serait de contrer certains effets induits par la PDT pouvant conduire à une stimulation de la croissance tumorale. L'équipe de Charles Gomer a ainsi montré l'efficacité de combiner la PDT à des traitements anti-angiogéniques<sup>(353, 447, 453, 454)</sup>.

Une **seconde stratégie** consisterait au contraire à utiliser les effets induits par la PDT. En effet, l'augmentation transitoire de la perméabilité des vaisseaux survenant juste avant la stase vasculaire permettrait d'augmenter la délivrance de macromolécules dans les tissus néoplasiques. L'équipe de Barbara Henderson a ainsi montré que la PDT permet d'accroître l'accumulation de doxorubicine dans des tumeurs implantées chez la souris<sup>(470)</sup>. Il est également envisageable de tirer parti de l'hypoxie générée au sein de la tumeur par la destruction des néovaisseaux, en utilisant conjointement des molécules bio-réductrices (*e.g.* mitomycine C, tirapazamine), qui sont des pro-drogues non actives en environnement normalement oxygéné, mais activées dans un environnement hypoxique<sup>(416, 471, 472)</sup>.

Par ailleurs, des améliorations peuvent être apportées à notre PS conjugué. Nous avons vu que l'augmentation de l'incorporation de TPC-Ahx-ATWLPPR pouvait en partie être due à des phénomènes non spécifiques <sup>(350)</sup>. Afin de pouvoir définir plus précisément la part d'incorporation intracellulaire provenant de mécanismes spécifiques par rapport à celle issue de mécanismes non spécifiques, nous étudions actuellement la possibilité de comparer ce degré d'incorporation entre des cellules exprimant NRP-1 (*e.g.* lignée de cancer du sein MDA-MB-231) et ces mêmes cellules traitées par **ARN interférence** pour éteindre l'expression du gène de NRP-1.

L'affinité du peptide pour NRP-1 est diminuée suite au couplage avec le PS. Cette **affinité** pourrait être améliorée en augmentant le ratio peptide :PS <sup>(279)</sup>, en couplant, par exemple, 4 molécules de peptide par molécule de PS, sur chacun des noyaux benzéniques (TPC-(Ahx-ATWLPPR)<sub>4</sub>). On peut par ailleurs imaginer qu'une telle molécule serait plus **hydrosoluble**, puisque le peptide est hydrophile et contient une charge positive au niveau de l'arginine, et que TPC-Ahx-ATWLPPR est effectivement plus hydrophile que TPC.

D'autre part, la partie peptidique de TPC-Ahx-ATWLPPR est dégradée *in vivo* par des peptidases, essentiellement au niveau du foie <sup>(432)</sup>. Nous travaillons actuellement au développement de pseudo-peptides **plus stables** (remplacement de L-acides aminés par des D-acides aminés et remplacement de la liaison peptidique sensible à la dégradation par une liaison plus résistante aux peptidases, *e.g.* liaison réduite -NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-). Par ailleurs, l'augmentation de l'hydrophilie du composé (par exemple, en utilisant TPC-(Ahx-ATWLPPR)<sub>4</sub>) permettrait une moindre accumulation du PS conjugué dans le système réticulo-endothélial (foie, rate), et donc une moindre dégradation du peptide.

## VII REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Pitot HC and Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J*, 1991; **5**(9): 2280-6.
2. Griffioen AW and Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*, 2000; **52**(2): 237-68.
3. Schraa AJ, Everts M, Kok RJ, Asgeirsdottir SA, Meijer DK, de Leij LF, and Molema G. Development of vasculature targeting strategies for the treatment of cancer and chronic inflammatory diseases. *Biotechnol Annu Rev*, 2002; **8**133-65.
4. Reynolds LP and Redmer DA. Angiogenesis in the placenta. *Biol Reprod*, 2001; **64**(4): 1033-40.
5. Bonnet CS and Walsh DA. Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation. *Rheumatology (Oxford)*, 2005; **44**(1): 7-16.
6. Kojda G and Hambrecht R. Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res*, 2005; **67**(2): 187-97.
7. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997; **386**(6626): 671-4.
8. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1995; **1**(1): 27-31.
9. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003; **9**(6): 653-60.
10. Vagnucci AH, Jr. and Li WW. Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet*, 2003; **361**(9357): 605-8.
11. Achen MG, McColl BK, and Stacker SA. Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. *Cancer Cell*, 2005; **7**(2): 121-7.
12. Nisato RE, Tille JC, and Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Thromb Haemost*, 2003; **90**(4): 591-7.
13. Stacker SA, Williams RA, and Achen MG. Lymphangiogenic growth factors as markers of tumor metastasis. *Apmis*, 2004; **112**(7-8): 539-49.
14. Pezzella F, Pastorino U, Tagliabue E, Andreola S, Sozzi G, Gasparini G, Menard S, Gatter KC, Harris AL, Fox S, Buyse M, Pilotti S, Pierotti M, and Rilke F. Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. *Am J Pathol*, 1997; **151**(5): 1417-23.
15. Ribatti D, Vacca A, and Dammacco F. New non-angiogenesis dependent pathways for tumour growth. *Eur J Cancer*, 2003; **39**(13): 1835-41.
16. Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, and Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 1999; **155**(3): 739-52.
17. Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, and Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; **97**(26): 14608-13.
18. Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, and Suda T. A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, 2000; **102**(2): 199-209.
19. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, and Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer*, 2002; **2**(11): 826-35.
20. Takahashi H and Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 2005; **109**(3): 227-41.
21. Gothert JR, Gustin SE, van Eekelen JA, Schmidt U, Hall MA, Jane SM, Green AR, Gottgens B, Izon DJ, and Begley CG. Genetically tagging endothelial cells in vivo: bone marrow-derived cells do not contribute to tumor endothelium. *Blood*, 2004; **104**(6): 1769-77.
22. Djonov V, Baum O, and Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 2003; **314**(1): 107-17.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

23. Scoazec J. [Tumor angiogenesis]. *Ann Pathol*, 2000; **20**(1): 25-37.
24. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, and Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem*, 2003; **49**(1): 32-40.
25. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 1990; **82**(1): 4-6.
26. Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 1996; **86**(3): 353-64.
27. Kerbel R and Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*, 2002; **2**(10): 727-39.
28. Pugh CW and Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 2003; **9**(6): 677-84.
29. Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003; **3**(6): 422-33.
30. Abedi H and Zachary I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 1997; **272**(24): 15442-51.
31. Vandembunder B. Angiogenèse et remodelage vasculaire au début du développement tumoral. *Médecine/sciences*, 2000; **16**:281-283.
32. McDonald DM and Baluk P. Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res*, 2002; **62**(18): 5381-5.
33. Jain RK and Booth MF. What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest*, 2003; **112**(8): 1134-6.
34. McDonald DM and Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med*, 2003; **9**(6): 713-25.
35. Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci*, 1998; **19**(6): 216-22.
36. Hlatky L, Tsionou C, Hahnfeldt P, and Coleman CN. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression. *Cancer Res*, 1994; **54**(23): 6083-6.
37. Crowther M, Brown NJ, Bishop ET, and Lewis CE. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*, 2001; **70**(4): 478-90.
38. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol*, 1992; **3**(2): 65-71.
39. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH, and Folkman J. Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1994; **59**:471-82.
40. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, and Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994; **79**(2): 315-28.
41. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, and Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997; **88**(2): 277-85.
42. Klagsbrun M and Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chem Biol*, 1999; **6**(8): R217-24.
43. Fayette J, Soria JC, and Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer*, 2005; **41**(8): 1109-16.
44. Liekens S, De Clercq E, and Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2001; **61**(3): 253-70.
45. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, and Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983; **219**(4587): 983-5.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

46. Ferrara N and Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **161**(2): 851-8.
47. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989; **246**(4935): 1306-9.
48. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, and Connolly DT. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 1989; **246**(4935): 1309-12.
49. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, and Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 1996; **380**(6573): 439-42.
50. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, and Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996; **380**(6573): 435-9.
51. Miquerol L, Langille BL, and Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 2000; **127**(18): 3941-6.
52. Ferrara N and Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997; **18**(1): 4-25.
53. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, and Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 2005; **65**(3): 550-63.
54. Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999; **13**(1): 9-22.
55. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, and Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*, 1999; **5**(6): 623-8.
56. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 2002; **20**(21): 4368-80.
57. Kim K.J. L, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 1993; **362**:841-844.
58. Melter M, Reinders ME, Sho M, Pal S, Geehan C, Denton MD, Mukhopadhyay D, and Briscoe DM. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*, 2000; **96**(12): 3801-8.
59. Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE, and Klagsbrun M. Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*, 1995; **55**(18): 4140-5.
60. Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, and Senger DR. Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell*, 1992; **3**(2): 211-20.
61. Shweiki D, Itin, A., Doffer, D., Keshet, E. Vascular Endothelial Growth Factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 1992; **359**:843-845.
62. Brogi E, Wu T, Namiki A, and Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation*, 1994; **90**(2): 649-52.
63. Goldberg MA and Schneider TJ. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *J Biol Chem*, 1994; **269**(6): 4355-9.
64. Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol*, 2002; **64**(5-6): 993-8.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

65. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 2004; **25**(4): 581-611.
66. Shima DT, Deutsch U, and D'Amore PA. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett*, 1995; **370**(3): 203-8.
67. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, and Erusalimsky JD. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation*, 1995; **92**(1): 11-4.
68. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, and Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*, 1995; **270**(21): 12607-13.
69. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpana A, Ferrara N, Saksela O, and Alitalo K. Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells. *J Biol Chem*, 1994; **269**(9): 6271-4.
70. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, and Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*, 1996; **271**(46): 29483-8.
71. Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, and Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1995; **270**(1): 308-12.
72. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, and Hla T. Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis. *FEBS Lett*, 1995; **372**(1): 83-7.
73. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, and Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1996; **271**(2): 736-41.
74. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, and Duh QY. Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines. *Surgery*, 1996; **120**(6): 944-7.
75. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, and Jaffe RB. Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998; **83**(4): 1342-7.
76. Schwarzenbach H, Chakrabarti G, Paust HJ, and Mukhopadhyay AK. Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells. *J Androl*, 2004; **25**(1): 128-39.
77. Cullinan-Bove K and Koos RD. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology*, 1993; **133**(2): 829-37.
78. Mueller MD, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, and Taylor RN. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; **97**(20): 10972-7.
79. Mueller MD, Vigne JL, Pritts EA, Chao V, Dreher E, and Taylor RN. Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells. *Fertil Steril*, 2003; **79**(2): 386-92.
80. Okada F, Rak JW, Croix BS, Lieubeau B, Kaya M, Roncari L, Shirasawa S, Sasazuki T, and Kerbel RS. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; **95**(7): 3609-14.
81. Zhang X, Gaspard JP, and Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*, 2001; **61**(16): 6050-4.
82. Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, and Abraham JA. Vascular endothelial growth factor: a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **165**(3): 1198-206.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

83. Muller YA, Christinger HW, Keyt BA, and de Vos AM. The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding. *Structure*, 1997; **5**(10): 1325-38.
84. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, and Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996; **93**(8): 1493-5.
85. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, and Leung DW. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol*, 1991; **5**(12): 1806-14.
86. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, and Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 1991; **266**(18): 11947-54.
87. Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ, and Bates DO. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, 2004; **64**(21): 7822-35.
88. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, and Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*, 1992; **267**(36): 26031-7.
89. Plouet J, Moro F, Bertagnolli S, Coldeboeuf N, Mazarguil H, Clamens S, and Bayard F. Extracellular cleavage of the vascular endothelial growth factor 189-amino acid form by urokinase is required for its mitogenic effect. *J Biol Chem*, 1997; **272**(20): 13390-6.
90. Lee S, Jilani SM, Nikolova GV, Carpizo D, and Iruela-Arispe ML. Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J Cell Biol*, 2005; **169**(4): 681-91.
91. Keyt BA, Nguyen HV, Berleau LT, Duarte CM, Park J, Chen H, and Ferrara N. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 1996; **271**(10): 5638-46.
92. Pan B, Li B, Russell SJ, Tom JY, Cochran AG, and Fairbrother WJ. Solution structure of a phage-derived peptide antagonist in complex with vascular endothelial growth factor. *J Mol Biol*, 2002; **316**(3): 769-87.
93. Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, and Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 1998; **92**(6): 735-45.
94. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, and Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem*, 2000; **275**(38): 29922.
95. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA, and Shima DT. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*, 1999; **5**(5): 495-502.
96. Maes C, Stockmans I, Moermans K, Van Looveren R, Smets N, Carmeliet P, Bouillon R, and Carmeliet G. Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. *J Clin Invest*, 2004; **113**(2): 188-99.
97. Bates DO, Hillman NJ, Williams B, Neal CR, and Pocock TM. Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors. *J Anat*, 2002; **200**(6): 581-97.
98. Yamazaki Y and Morita T. Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*, 2006; **10**(4): 515-27.
99. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, and Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; **88**(20): 9267-71.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

100. Persico MG, Vincenti V, and DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999; **237**:31-40.
101. Torry DS, Mukherjea D, Arroyo J, and Torry RJ. Expression and function of placenta growth factor: implications for abnormal placentation. *J Soc Gynecol Investig*, 2003; **10**(4): 178-88.
102. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, and Ferrara N. Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 1994; **269**(41): 25646-54.
103. Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S, Aonuma M, and Shibuya M. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ*, 1996; **7**(2): 213-21.
104. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del Vecchio S, Lei KJ, Chou JY, and Persico MG. Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene*, 1993; **8**(4): 925-31.
105. Cao Y, Ji WR, Qi P, and Rosin A. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997; **235**(3): 493-8.
106. Yang W, Ahn H, Hinrichs M, Torry RJ, and Torry DS. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol*, 2003; **60**(1): 53-60.
107. Christinger HW, Fuh G, de Vos AM, and Wiesmann C. The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1. *J Biol Chem*, 2004; **279**(11): 10382-8.
108. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Shibuya M, Collen D, Conway EM, and Carmeliet P. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*, 2003; **9**(7): 936-43.
109. Cao Y, Chen H, Zhou L, Chiang MK, Anand-Apte B, Weatherbee JA, Wang Y, Fang F, Flanagan JG, and Tsang ML. Heterodimers of placenta growth factor/vascular endothelial growth factor. Endothelial activity, tumor cell expression, and high affinity binding to Flk-1/KDR. *J Biol Chem*, 1996; **271**(6): 3154-62.
110. DiSalvo J, Bayne ML, Conn G, Kwok PW, Trivedi PG, Soderman DD, Palisi TM, Sullivan KA, and Thomas KA. Purification and characterization of a naturally occurring vascular endothelial growth factor/placenta growth factor heterodimer. *J Biol Chem*, 1995; **270**(13): 7717-23.
111. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, and Eriksson U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; **93**(6): 2576-81.
112. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, and Alitalo K. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. *Curr Opin Biotechnol*, 1999; **10**(6): 528-35.
113. Olofsson B, Pajusola K, von Euler G, Chilov D, Alitalo K, and Eriksson U. Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J Biol Chem*, 1996; **271**(32): 19310-7.
114. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, and Alitalo K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, 1996; **15**(7): 1751.
115. Lohela M, Saaristo A, Veikkola T, and Alitalo K. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost*, 2003; **90**(2): 167-84.
116. Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, Jeltsch M, Jackson DG, Talikka M, Rauvala H, Betsholtz C, and Alitalo K. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*, 2004; **5**(1): 74-80.
117. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, Jackson DG, Nishikawa S, Kubo H, and Achen MG. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*, 2001; **7**(2): 186-91.



## Partie VII : Références bibliographiques

---

118. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, and Robinson AJ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*, 1994; **68**(1): 84-92.
119. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, and Stacker SA. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; **96**(6): 3071-6.
120. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, and Shibuya M. A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem*, 1998; **273**(47): 31273-82.
121. Wise LM, Ueda N, Dryden NH, Fleming SB, Caesar C, Roufail S, Achen MG, Stacker SA, and Mercer AA. Viral vascular endothelial growth factors vary extensively in amino acid sequence, receptor-binding specificities, and the ability to induce vascular permeability yet are uniformly active mitogens. *J Biol Chem*, 2003; **278**(39): 38004-14.
122. Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, and Dehio C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J*, 1999; **18**(2): 363-74.
123. Tokunaga Y, Yamazaki Y, and Morita T. Localization of heparin- and neuropilin-1-recognition sites of viral VEGFs. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; **348**(3): 957-62.
124. Junqueira de Azevedo IL, Farsky SH, Oliveira ML, and Ho PL. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. *J Biol Chem*, 2001; **276**(43): 39836-42.
125. Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, and Shibuya M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. *J Biol Chem*, 2004; **279**(44): 46304-14.
126. Komori Y, Nikai T, Taniguchi K, Masuda K, and Sugihara H. Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of *Vipera aspis aspis* (Aspic viper). *Biochemistry*, 1999; **38**(36): 11796-803.
127. Gasmi A, Bourcier C, Aloui Z, Srairi N, Marchetti S, Gimond C, Wedge SR, Hennequin L, and Pouyssegur J. Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from *Vipera lebetina* venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling. *J Biol Chem*, 2002; **277**(33): 29992-8.
128. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, and Morita T. Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2). *J Biol Chem*, 2003; **278**(52): 51985-8.
129. Yamane A, Seetharam L, Yamaguchi S, Gotoh N, Takahashi T, Neufeld G, and Shibuya M. A new communication system between hepatocytes and sinusoidal endothelial cells in liver through vascular endothelial growth factor and Flt tyrosine kinase receptor family (Flt-1 and KDR/Flk-1). *Oncogene*, 1994; **9**(9): 2683-90.
130. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, and Williams LT. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992; **255**(5047): 989-91.
131. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, and Bohlen P. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; **187**(3): 1579-86.
132. Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, and Williams LT. Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993; **90**(16): 7533-7.
133. Fuh G, Li B, Crowley C, Cunningham B, and Wells JA. Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998; **273**(18): 11197-204.
134. Barleon B, Totzke F, Herzog C, Blanke S, Kremmer E, Siemeister G, Marme D, and Martiny-Baron G. Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1. *J Biol Chem*, 1997; **272**(16): 10382-8.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

135. Wiesmann C, Christinger HW, Cochran AG, Cunningham BC, Fairbrother WJ, Keenan CJ, Meng G, and de Vos AM. Crystal structure of the complex between VEGF and a receptor-blocking peptide. *Biochemistry*, 1998; **37**(51): 17765-72.
136. Shinkai A, Ito M, Anazawa H, Yamaguchi S, Shitara K, and Shibuya M. Mapping of the sites involved in ligand association and dissociation at the extracellular domain of the kinase insert domain-containing receptor for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 1998; **273**(47): 31283-8.
137. Tao Q, Backer MV, Backer JM, and Terman BI. Kinase insert domain receptor (KDR) extracellular immunoglobulin-like domains 4-7 contain structural features that block receptor dimerization and vascular endothelial growth factor-induced signaling. *J Biol Chem*, 2001; **276**(24): 21916-23.
138. Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, and Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood*, 1996; **87**(8): 3336-43.
139. Clauss M, Weich H, Breier G, Knies U, Rockl W, Waltenberger J, and Risau W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J Biol Chem*, 1996; **271**(30): 17629-34.
140. Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, and Shibuya M. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*, 2001; **97**(3): 785-91.
141. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendriks J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, and Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med*, 2002; **8**(8): 841-9.
142. Hiratsuka S, Minowa O, Kuno J, Noda T, and Shibuya M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; **95**(16): 9349-54.
143. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, and Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995; **376**(6535): 66-70.
144. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, and Peng J. Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice. *Development*, 1999; **126**(13): 3015-25.
145. Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, and Sato Y. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, 2000; **19**(17): 2138-46.
146. Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, and Claesson-Welsh L. Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int J Biochem Cell Biol*, 2001; **33**(4): 315-24.
147. Neagoe PE, Lemieux C, and Sirois MG. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer. *J Biol Chem*, 2005.
148. Kendall RL, Wang G, and Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; **226**(2): 324-8.
149. Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, and Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res*, 1995; **55**(23): 5687-92.
150. Grosskreutz CL, Anand-Apte B, Duplaa C, Quinn TP, Terman BI, Zetter B, and D'Amore PA. Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Microvasc Res*, 1999; **58**(2): 128-36.
151. Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, and Wijelath ES. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 2001; **188**(3): 359-68.
152. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, and Schuh AC. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995; **376**(6535): 62-6.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

153. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, and Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*, 2002; **196**(11): 1497-506.
154. Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, and Detmar M. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *Faseb J*, 2004; **18**(10): 1111-3.
155. Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, and Kerbel RS. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*, 2004; **2**(6): 315-26.
156. Gerber HP, Dixit V, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998; **273**(21): 13313-6.
157. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 1998; **273**(46): 30336-43.
158. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, and Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*, 1999; **103**(2): 159-65.
159. Fujio Y and Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem*, 1999; **274**(23): 16349-54.
160. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, and Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 1999; **98**(2): 147-57.
161. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, and Feder J. Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. *J Biol Chem*, 1989; **264**(33): 20017-24.
162. Shulman K, Rosen S, Tognazzi K, Manseau EJ, and Brown LF. Expression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) is altered in many glomerular diseases. *J Am Soc Nephrol*, 1996; **7**(5): 661-6.
163. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, and Montesano R. Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; **189**(2): 824-31.
164. Avraham HK, Lee TH, Koh Y, Kim TA, Jiang S, Sussman M, Samarel AM, and Avraham S. Vascular endothelial growth factor regulates focal adhesion assembly in human brain microvascular endothelial cells through activation of the focal adhesion kinase and related adhesion focal tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2003; **278**(38): 36661-8.
165. Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, and Plow EF. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol Cell*, 2000; **6**(4): 851-60.
166. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, and Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci*, 2003; **28**(9): 488-94.
167. Kaipainen A, Korhonen J, Mustonen T, van Hinsbergh VW, Fang GH, Dumont D, Breitman M, and Alitalo K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; **92**(8): 3566-70.
168. Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, Breitman M, and Alitalo K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science*, 1998; **282**(5390): 946-9.
169. Dixelius J, Makinen T, Wirzenius M, Karkkainen MJ, Wernstedt C, Alitalo K, and Claesson-Welsh L. Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites. *J Biol Chem*, 2003; **278**(42): 40973-9.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

170. Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y, and Neufeld G. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J Biol Chem*, 2000; **275**(24): 18040-5.
171. Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G, and Fujisawa H. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron*, 1991; **7**(2): 295-307.
172. Nakamura F and Goshima Y. Structural and functional relation of neuropilins. *Adv Exp Med Biol*, 2002; **515**:55-69.
173. Ellis LM. The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*, 2006; **5**(5): 1099-107.
174. Miao HQ and Klagsbrun M. Neuropilin is a mediator of angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev*, 2000; **19**(1-2): 29-37.
175. Miao HQ, Lee P, Lin H, Soker S, and Klagsbrun M. Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *Faseb J*, 2000; **14**(15): 2532-9.
176. Klagsbrun M and Eichmann A. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005; **16**(4-5): 535-48.
177. Soker S, Fidler H, Neufeld G, and Klagsbrun M. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain. *J Biol Chem*, 1996; **271**(10): 5761-7.
178. Neufeld G, Cohen T, Shraga N, Lange T, Kessler O, and Herzog Y. The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*, 2002; **12**(1): 13-9.
179. Rossignol M, Gagnon ML, and Klagsbrun M. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics*, 2000; **70**(2): 211-22.
180. Cackowski FC, Xu L, Hu B, and Cheng SY. Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics*, 2004; **84**(1): 82-94.
181. Gagnon ML, Bielenberg DR, Gechtman Z, Miao HQ, Takashima S, Soker S, and Klagsbrun M. Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; **97**(6): 2573-8.
182. Yamada Y, Takakura N, Yasue H, Ogawa H, Fujisawa H, and Suda T. Exogenous clustered neuropilin 1 enhances vasculogenesis and angiogenesis. *Blood*, 2001; **97**(6): 1671-8.
183. Chen H, Chedotal A, He Z, Goodman CS, and Tessier-Lavigne M. Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron*, 1997; **19**(3): 547-59.
184. Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ, and Mercurio AM. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res*, 2003; **63**(17): 5230-3.
185. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, and Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004; **101**(31): 11432-7.
186. Nasarre P, Constantin B, Rouhaud L, Harnois T, Raymond G, Drabkin HA, Bourmeyster N, and Roche J. Semaphorin SEMA3F and VEGF have opposing effects on cell attachment and spreading. *Neoplasia*, 2003; **5**(1): 83-92.
187. Brambilla E, Constantin B, Drabkin H, and Roche J. Semaphorin SEMA3F localization in malignant human lung and cell lines: A suggested role in cell adhesion and cell migration. *Am J Pathol*, 2000; **156**(3): 939-50.
188. Miao HQ, Soker S, Feiner L, Alonso JL, Raper JA, and Klagsbrun M. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol*, 1999; **146**(1): 233-42.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

189. Karpanen T, Heckman CA, Keskitalo S, Jeltsch M, Ollila H, Neufeld G, Tamagnone L, and Alitalo K. Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *Faseb J*, 2006; **20**(9): 1462-72.
190. Renzi MJ, Feiner L, Koppel AM, and Raper JA. A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J Neurosci*, 1999; **19**(18): 7870-80.
191. Gu C, Limberg BJ, Whitaker GB, Perman B, Leahy DJ, Rosenbaum JS, Ginty DD, and Kolodkin AL. Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J Biol Chem*, 2002; **277**(20): 18069-76.
192. Mamluk R, Gechtman Z, Kutcher ME, Gasiunas N, Gallagher J, and Klagsbrun M. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem*, 2002; **277**(27): 24818-25.
193. Furumatsu T, Shen ZN, Kawai A, Nishida K, Manabe H, Oohashi T, Inoue H, and Ninomiya Y. Vascular endothelial growth factor principally acts as the main angiogenic factor in the early stage of human osteoblastogenesis. *J Biochem (Tokyo)*, 2003; **133**(5): 633-9.
194. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, and Brenner RE. Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 2002; **30**(3): 472-7.
195. Cohen T, Gluzman-Poltorak Z, Brodzky A, Meytal V, Sabo E, Misselevich I, Hassoun M, Boss JH, Resnick M, Shneyvas D, Eldar S, and Neufeld G. Neuroendocrine cells along the digestive tract express neuropilin-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; **284**(2): 395-403.
196. Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, and Romeo PH. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol*, 2002; **3**(5): 477-82.
197. Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, and Schmitz J. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol*, 2002; **63**(12): 1133-48.
198. Belaid Z, Hubint F, Humblet C, Boniver J, Nusgens B, and Defresne MP. Differential expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic and fatty bone marrow: evidence that neuropilin-1 is produced by fat cells. *Haematologica*, 2005; **90**(3): 400-1.
199. Tordjman R, Ortega N, Coulombel L, Plouet J, Romeo PH, and Lemarchandel V. Neuropilin-1 is expressed on bone marrow stromal cells: a novel interaction with hematopoietic cells? *Blood*, 1999; **94**(7): 2301-9.
200. Harper SJ, Xing CY, Whittle C, Parry R, Gillatt D, Peat D, and Mathieson PW. Expression of neuropilin-1 by human glomerular epithelial cells in vitro and in vivo. *Clin Sci (Lond)*, 2001; **101**(4): 439-46.
201. Stephenson JM, Banerjee S, Saxena NK, Cherian R, and Banerjee SK. Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int J Cancer*, 2002; **101**(5): 409-14.
202. Soker S, Gollamudi-Payne S, Fidler IJ, Charnahelli H, and Klagsbrun M. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165. *J Biol Chem*, 1997; **272**(50): 31582-8.
203. Broholm H and Laursen H. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *Apmis*, 2004; **112**(4-5): 257-63.
204. Fakhari M, Pullirsch D, Abraham D, Paya K, Hofbauer R, Holzfeind P, Hofmann M, and Aharinejad S. Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer*, 2002; **94**(1): 258-63.
205. Straume O and Akslen LA. Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis*, 2003; **6**(4): 295-301.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

206. Herzog Y, Kalcheim C, Kahane N, Reshef R, and Neufeld G. Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech Dev*, 2001; **109**(1): 115-9.
207. Klagsbrun M, Takashima S, and Mamluk R. The role of neuropilin in vascular and tumor biology. *Adv Exp Med Biol*, 2002; **515**:33-48.
208. Oh H, Takagi H, Otani A, Koyama S, Kemmochi S, Uemura A, and Honda Y. Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; **99**(1): 383-8.
209. Kawakami T, Tokunaga T, Hatanaka H, Kijima H, Yamazaki H, Abe Y, Osamura Y, Inoue H, Ueyama Y, and Nakamura M. Neuropilin 1 and neuropilin 2 co-expression is significantly correlated with increased vascularity and poor prognosis in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*, 2002; **95**(10): 2196-201.
210. Ding H, Wu X, Roncari L, Lau N, Shannon P, Nagy A, and Guha A. Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int J Cancer*, 2000; **88**(4): 584-92.
211. Jogi A, Vallon-Christersson J, Holmquist L, Axelson H, Borg A, and Pahlman S. Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Exp Cell Res*, 2004; **295**(2): 469-87.
212. Parikh AA, Liu WB, Fan F, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bruns CJ, Bucana CD, Evans DB, and Ellis LM. Expression and regulation of the novel vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 by epidermal growth factor in human pancreatic carcinoma. *Cancer*, 2003; **98**(4): 720-9.
213. Parikh AA, Fan F, Liu WB, Ahmad SA, Stoeltzing O, Reinmuth N, Bielenberg D, Bucana CD, Klagsbrun M, and Ellis LM. Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am J Pathol*, 2004; **164**(6): 2139-51.
214. Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y, Matsuda Y, Sanbo M, Yagi T, and Fujisawa H. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development*, 1999; **126**(21): 4895-902.
215. Yuan L, Moyon D, Pardanaud L, Breant C, Karkkainen MJ, Alitalo K, and Eichmann A. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*, 2002; **129**(20): 4797-806.
216. Latil A, Bieche I, Pesche S, Valeri A, Fournier G, Cussenot O, and Lidereau R. VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int J Cancer*, 2000; **89**(2): 167-71.
217. Hansel DE, Wilentz RE, Yeo CJ, Schulick RD, Montgomery E, and Maitra A. Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am J Surg Pathol*, 2004; **28**(3): 347-56.
218. Lantuejoul S, Constantin B, Drabkin H, Brambilla C, Roche J, and Brambilla E. Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J Pathol*, 2003; **200**(3): 336-47.
219. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, Li W, Charytonowicz E, Belbin TJ, Prystowsky MB, Ortiz AR, Childs G, and Cordon-Cardo C. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol*, 2003; **163**(2): 505-16.
220. Gray MJ, Wey JS, Belcheva A, McCarty MF, Trevino JG, Evans DB, Ellis LM, and Gallick GE. Neuropilin-1 suppresses tumorigenic properties in a human pancreatic adenocarcinoma cell line lacking neuropilin-1 coreceptors. *Cancer Res*, 2005; **65**(9): 3664-70.
221. Tamagnone L, Artigiani S, Chen H, He Z, Ming GI, Song H, Chedotal A, Winberg ML, Goodman CS, Poo M, Tessier-Lavigne M, and Comoglio PM. Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell*, 1999; **99**(1): 71-80.
222. Whitaker GB, Limberg BJ, and Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem*, 2001; **276**(27): 25520-31.
223. Soker S, Miao HQ, Nomi M, Takashima S, and Klagsbrun M. VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J Cell Biochem*, 2002; **85**(2): 357-68.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

224. Rollin S, Lemieux C, Maliba R, Favier J, Villeneuve LR, Allen BG, Soker S, Bazan NG, Merhi Y, and Sirois MG. VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis. *Blood*, 2004; **103**(10): 3789-97.
225. Bernatchez PN, Rollin S, Soker S, and Sirois MG. Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1. *J Cell Biochem*, 2002; **85**(3): 629-39.
226. Fuh G, Garcia KC, and de Vos AM. The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J Biol Chem*, 2000; **275**(35): 26690-5.
227. Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herault JP, Neufeld G, Savi P, Herbert JM, and Bono F. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood*, 2006; **108**(4): 1243-50.
228. Li M, Yang H, Chai H, Fisher WE, Wang X, Brunicardi FC, Yao Q, and Chen C. Pancreatic carcinoma cells express neuropilins and vascular endothelial growth factor, but not vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer*, 2004; **101**(10): 2341-50.
229. Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, and Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. *Cancer Res*, 2001; **61**(15): 5736-40.
230. Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, Condrón CM, Devocelle M, Harriott P, Bouchier-Hayes DJ, and Harmey JH. A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer*, 2005.
231. Beierle EA, Dai W, Langham MR, Jr., Copeland EM, 3rd, and Chen MK. Expression of VEGF receptors in cocultured neuroblastoma cells. *J Surg Res*, 2004; **119**(1): 56-65.
232. Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, and Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem*, 2003; **278**(49): 48848-60.
233. Murga M, Fernandez-Capetillo O, and Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood*, 2005; **105**(5): 1992-9.
234. Cai H and Reed RR. Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J Neurosci*, 1999; **19**(15): 6519-27.
235. Wang L, Mukhopadhyay D, and Xu X. C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *Faseb J*, 2006; **20**(9): 1513-5.
236. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England Journal of Medicine*, 1971; **285**(21): 1182-1186.
237. Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, and Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol*, 1997; **150**(3): 815-21.
238. Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, and Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 1999; **341**(21): 1565-71.
239. Scappaticci FA. The therapeutic potential of novel antiangiogenic therapies. *Expert Opin Investig Drugs*, 2003; **12**(6): 923-32.
240. Ranson M. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer*, 2004; **90**(12): 2250-5.
241. Riedel F, Gotte K, Goessler U, Sadick H, and Hormann K. Targeting chemotherapy-induced VEGF up-regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines. *Anticancer Res*, 2004; **24**(4): 2179-83.
242. Hotz HG, Hines OJ, Masood R, Hotz B, Foitzik T, Buhr HJ, Gill PS, and Reber HA. VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. *Surgery*, 2005; **137**(2): 192-9.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

243. Weng DE and Usman N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep*, 2001; **3**(2): 141-6.
244. Quirt I, Bodurth A, Lohmann R, Rusthoven J, Belanger K, Young V, Wainman N, Stewar W, and Eisenhauer E. Phase II study of marimastat (BB-2516) in malignant melanoma: a clinical and tumor biopsy study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs*, 2002; **20**(4): 431-7.
245. Miller KD, Gradishar W, Schuchter L, Sparano JA, Cobleigh M, Robert N, Rasmussen H, and Sledge GW. A randomized phase II pilot trial of adjuvant marimastat in patients with early-stage breast cancer. *Ann Oncol*, 2002; **13**(8): 1220-4.
246. Overall CM and Kleinfeld O. Towards third generation matrix metalloproteinase inhibitors for cancer therapy. *Br J Cancer*, 2006; **94**(7): 941-6.
247. Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 2005; **9**(2): 267-85.
248. Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, Watkins JD, Huse WD, Bodkin DJ, and Cheresh DA. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin Cancer Res*, 2000; **6**(8): 3056-61.
249. Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep*, 2006; **8**(2): 96-103.
250. Eskens FA, Dumez H, Hoekstra R, Perschl A, Brindley C, Bottcher S, Wynendaele W, Dreys J, Verweij J, and van Oosterom AT. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer*, 2003; **39**(7): 917-26.
251. Kaiser PK. Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *Am J Ophthalmol*, 2006; **142**(4): 660-8.
252. Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY, and Jain RK. Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivascular effects in human rectal cancer. *Nat Med*, 2004; **10**(2): 145-7.
253. Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, and Rudge JS. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002; **99**(17): 11393-8.
254. Huang J, Frischer JS, Serur A, Kadenhe A, Yokoi A, McCrudden KW, New T, O'Toole K, Zabski S, Rudge JS, Holash J, Yancopoulos GD, Yamashiro DJ, and Kandel JJ. Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003; **100**(13): 7785-90.
255. Konner J and Dupont J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer*, 2004; **4 Suppl 2**S81-5.
256. Posey JA, Ng TC, Yang B, Khazaeli MB, Carpenter MD, Fox F, Needle M, Waksal H, and LoBuglio AF. A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2003; **9**(4): 1323-32.
257. Marx J. Angiogenesis. A boost for tumor starvation. *Science*, 2003; **301**(5632): 452-4.
258. Marx J. Cancer. Encouraging results for second-generation antiangiogenesis drugs. *Science*, 2005; **308**(5726): 1248-9.
259. Kruger EA, Duray PH, Price DK, Pluda JM, and Figg WD. Approaches to preclinical screening of antiangiogenic agents. *Semin Oncol*, 2001; **28**(6): 570-6.
260. Davis DW, McConkey DJ, Abbruzzese JL, and Herbst RS. Surrogate markers in antiangiogenesis clinical trials. *Br J Cancer*, 2003; **89**(1): 8-14.
261. Klauber N, Rohan RM, Flynn E, and D'Amato RJ. Critical components of the female reproductive pathway are suppressed by the angiogenesis inhibitor AGM-1470. *Nat Med*, 1997; **3**(4): 443-6.



## Partie VII : Références bibliographiques

---

262. Shimizu K and Oku N. Cancer anti-angiogenic therapy. *Biol Pharm Bull*, 2004; **27**(5): 599-605.
263. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, and Andriopoulou P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans*, 2002; **30**(2): 173-7.
264. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, and Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*, 2005; **9**(4): 777-94.
265. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*, 2005; **307**(5706): 58-62.
266. Kerbel RS. Antiangiogenic therapy: a universal chemosensitization strategy for cancer? *Science*, 2006; **312**(5777): 1171-5.
267. Shimizu K, Asai T, and Oku N. Antineovascular therapy, a novel antiangiogenic approach. *Expert Opin Ther Targets*, 2005; **9**(1): 63-76.
268. Denekamp J. Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta Radiol Oncol*, 1984; **23**(4): 217-25.
269. Molema G, Meijer DK, and de Leij LF. Tumor vasculature targeted therapies: getting the players organized. *Biochem Pharmacol*, 1998; **55**(12): 1939-45.
270. Arora N, Masood R, Zheng T, Cai J, Smith DL, and Gill PS. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Res*, 1999; **59**(1): 183-8.
271. Trachsel E and Neri D. Antibodies for angiogenesis inhibition, vascular targeting and endothelial cell transcytosis. *Adv Drug Deliv Rev*, 2006; **58**(5-6): 735-54.
272. D'Andrea LD, Del Gatto A, Pedone C, and Benedetti E. Peptide-based molecules in angiogenesis. *Chem Biol Drug Des*, 2006; **67**(2): 115-26.
273. Zachary I. VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. *Biochem Soc Trans*, 2003; **31**(Pt 6): 1171-7.
274. Schneider R, Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Gravier J, Guillemin F, and Barberi-Heyob M. Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006; **6**(5): 469-88.
275. Narazaki M and Tosato G. Ligand-induced internalization selects use of common receptor neuropilin-1 by VEGF165 and semaphorin3A. *Blood*, 2006; **107**(10): 3892-901.
276. Cescato R, Schulz S, Waser B, Eltschinger V, Rivier JE, Wester HJ, Culler M, Ginj M, Liu Q, Schonbrunn A, and Reubi JC. Internalization of sst2, sst3, and sst5 receptors: effects of somatostatin agonists and antagonists. *J Nucl Med*, 2006; **47**(3): 502-11.
277. Ginj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, Erchegyi J, Rivier J, Macke HR, and Reubi JC. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006; **103**(44): 16436-41.
278. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouet J, Derbin C, Perret G, and Mazie JC. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J*, 2000; **19**(7): 1525-33.
279. von Wronski MA, Raju N, Pillai R, Bogdan NJ, Marinelli ER, Nanjappan P, Ramalingam K, Arunachalam T, Eaton S, Linder KE, Yan F, Pochon S, Tweedle MF, and Nunn AD. Tuftsin binds neuropilin-1 through a sequence similar to that encoded by exon 8 of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 2006; **281**(9): 5702-10.
280. Jia H, Bagherzadeh A, Hartzoulakis B, Jarvis A, Lohr M, Shaikh S, Aqil R, Cheng L, Tickner M, Esposito D, Harris R, Driscoll PC, Selwood DL, and Zachary IC. Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. *J Biol Chem*, 2006; **281**(19): 13493-502.
281. El-Mousawi M, Tchistiakova L, Yurchenko L, Pietrzynski G, Moreno M, Stanimirovic D, Ahmad D, and Alakhov V. A vascular endothelial growth factor high affinity receptor 1-specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library. *J Biol Chem*, 2003; **278**(47): 46681-91.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

282. El-Mousawi M, Tchistiakova L, Yurchenko L, Pietrzynski G, Moreno M, Stanimirovic D, Ahmad D, and Alakhov V. A VEGF high affinity receptor 1 specific peptide with antiangiogenic activity identified using a phage display peptide library. *J Biol Chem*, 2003; **22**.
283. Bae DG, Kim TD, Li G, Yoon WH, and Chae CB. Anti-flt1 peptide, a vascular endothelial growth factor receptor 1-specific hexapeptide, inhibits tumor growth and metastasis. *Clin Cancer Res*, 2005; **11**(7): 2651-61.
284. Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraudo E, Benelli R, Primo L, Noonan D, Salio M, Camussi G, Rockl W, and Bussolino F. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med*, 1996; **2**(12): 1371-5.
285. Hetian L, Ping A, Shumei S, Xiaoying L, Luowen H, Jian W, Lin M, Meisheng L, Junshan Y, and Chengchao S. A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial growth factor to its kinase domain receptor. *J Biol Chem*, 2002; **277**(45): 43137-42.
286. An P, Lei H, Zhang J, Song S, He L, Jin G, Liu X, Wu J, Meng L, Liu M, and Shou C. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *Int J Cancer*, 2004; **111**(2): 165-73.
287. Jia H, Jezequel S, Lohr M, Shaikh S, Davis D, Soker S, Selwood D, and Zachary I. Peptides encoded by exon 6 of VEGF inhibit endothelial cell biological responses and angiogenesis induced by VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; **283**(1): 164-73.
288. Zilberberg L, Shinkaruk S, Lequin O, Rousseau B, Hagedorn M, Costa F, Caronzolo D, Balke M, Canron X, Convert O, Lain G, Gionnet K, Goncalves M, Bayle M, Bello L, Chassaing G, Deleris G, and Bikfalvi A. Structure and inhibitory effects on angiogenesis and tumor development of a new vascular endothelial growth inhibitor. *J Biol Chem*, 2003; **278**(37): 35564-73.
289. Giordano RJ, Cardo-Vila M, Lahdenranta J, Pasqualini R, and Arap W. Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med*, 2001; **7**(11): 1249-53.
290. Gately S and Kerbel R. Antiangiogenic scheduling of lower dose cancer chemotherapy. *Cancer J*, 2001; **7**(5): 427-36.
291. Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, and Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*, 2000; **60**(7): 1878-86.
292. Man S, Bocci G, Francia G, Green SK, Jothy S, Hanahan D, Bohlen P, Hicklin DJ, Bergers G, and Kerbel RS. Antitumor effects in mice of low-dose (metronomic) cyclophosphamide administered continuously through the drinking water. *Cancer Res*, 2002; **62**(10): 2731-5.
293. Orlando L, Cardillo A, Rocca A, Balduzzi A, Ghisini R, Peruzzotti G, Goldhirsch A, D'Alessandro C, Cinieri S, Preda L, and Colleoni M. Prolonged clinical benefit with metronomic chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs*, 2006; **17**(8): 961-7.
294. Hanahan D, Bergers G, and Bergsland E. Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*, 2000; **105**(8): 1045-7.
295. Ciulla TA, Danis RP, Criswell M, and Pratt LM. Changing therapeutic paradigms for exudative age-related macular degeneration: antiangiogenic agents and photodynamic therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, 1999; **8**(12): 2173-2182.
296. Bisland SK, Lilje L, Lin A, Rusnov R, and Wilson BC. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol*, 2004; **80**:22-30.
297. Raab O. Uber die wirkung fluorescierender stoffe auf infusoria. *Z Biol*, 1900; **39**:524-530.
298. Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, and Mittleman A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res*, 1978; **38**(8): 2628-35.
299. Schwartz S, Absolon K, and Vermund H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Med Bull*, 1955; **68**:7-13.
300. Brown SB, Brown EA, and Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol*, 2004; **5**(8): 497-508.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

301. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, and Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist*, 2006; **11**(9): 1034-44.
302. Hsi RA, Rosenthal DI, and Glatstein E. Photodynamic therapy in the treatment of cancer: current state of the art. *Drugs*, 1999; **57**(5): 725-34.
303. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, and Peng Q. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*, 1998; **90**(12): 889-905.
304. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B*, 1997; **39**(1): 1-18.
305. Vogl TJ, Eichler K, Mack MG, Zangos S, Herzog C, Thalhammer A, and Engelmann K. Interstitial photodynamic laser therapy in interventional oncology. *Eur Radiol*, 2004; **14**(6): 1063-73.
306. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*, 1991; **54**(5): 659.
307. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res*, 1999; **31**(4): 261-72.
308. Wilson BC and van Lier JE. Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 1989; **3**(3): 459-63.
309. Moan J and Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 1991; **53**(4): 549-53.
310. Foote CS, Shook FC, and Abakerli RB. Characterization of singlet oxygen. *Methods Enzymol*, 1984; **105**:36-47.
311. Davies MJ. Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci*, 2004; **3**(1): 17-25.
312. Takemura T, Ohta N, Nakajima S, and Sakata I. Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem Photobiol*, 1989; **50**(3): 339-44.
313. Weersink RA, Bogaards A, Gertner M, Davidson SR, Zhang K, Netchev G, Trachtenberg J, and Wilson BC. Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities. *J Photochem Photobiol B*, 2005; **79**(3): 211-22.
314. Sharman WM, van Lier JE, and Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004; **56**(1): 53-76.
315. van Dongen GA, Visser GW, and Vrouenraets MB. Photosensitizer-antibody conjugates for detection and therapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004; **56**(1): 31-52.
316. Peng Q, Moan J, and Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol*, 1996; **20**(2): 109-129.
317. Piette J, Volanti C, Vantieghem A, Matroule JY, Habraken Y, and Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol*, 2003; **66**(8): 1651-9.
318. Agostinis P, Buytaert E, Breysens H, and Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci*, 2004; **3**(8): 721-9.
319. Castano AP, Mroz P, and Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*, 2006; **6**(7): 535-45.
320. Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, and Agostinis P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *Faseb J*, 2006; **20**(6): 756-8.
321. Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR, and Agostinis P. Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 2006; **2**(3): 238-40.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

322. Kessel D, Vicente MG, and Reiners JJ, Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy*, 2006; **2**(4): 289-90.
323. Fingar VH, Taber SW, Haydon PS, Harrison LT, Kempf SJ, and Wieman TJ. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo*, 2000; **14**(1): 93-100.
324. Huang Z, Chen Q, Luck D, Beckers J, Wilson BC, Trncic N, Larue SM, Blanc D, and Hetzel FW. Studies of a vascular-acting photosensitizer, Pd-bacteriopheophorbide (Tookad), in normal canine prostate and spontaneous canine prostate cancer. *Lasers Surg Med*, 2005; **36**(5): 390-7.
325. McMahon KS, Wieman TJ, Moore PH, and Fingar VH. Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. *Cancer Res*, 1994; **54**(20): 5374-9.
326. Wieman TJ, Mang TS, Fingar VH, Hill TG, Reed MW, Corey TS, Nguyen VQ, and Render ER, Jr. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, 1988; **104**(3): 512-7.
327. Fingar VH, Wieman TJ, Wiehle SA, and Cerrito PB. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res*, 1992; **52**(18): 4914-21.
328. Krammer B. Vascular effects of photodynamic therapy. *Anticancer Res*, 2001; **21**(6B): 4271-7.
329. Fingar VH. Vascular effects of photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*, 1996; **14**(5): 323-8.
330. Triesscheijn M, Ruevekamp M, Aalders M, Baas P, and Stewart FA. Comparative sensitivity of microvascular endothelial cells, fibroblasts and tumor cells after in vitro photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin. *Photochem Photobiol*, 2004; **80**(2): 236-41.
331. Chen B, Pogue BW, Luna JM, Hardman RL, Hoopes PJ, and Hasan T. Tumor vascular permeabilization by vascular-targeting photosensitization: effects, mechanism, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*, 2006; **12**(3 Pt 1): 917-23.
332. Sporn LA and Foster TH. Photofrin and light induces microtubule depolymerization in cultured human endothelial cells. *Cancer Res*, 1992; **52**(12): 3443-8.
333. Fingar VH, Wieman TJ, and Doak KW. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy-induced tumor destruction. *Cancer Res*, 1990; **50**(9): 2599-603.
334. Fingar VH, Wieman TJ, and Haydon PS. The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin. *Photochem Photobiol*, 1997; **66**(4): 513-7.
335. Leveckis J, Brown NJ, and Reed MW. The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo. *Br J Cancer*, 1995; **72**(5): 1113-9.
336. Scherz A and Salomon Y. *Vascular-targeted photodynamic therapy (VTP) with Tookad: from laboratory bench to clinical trials*. in *6th International Symposium on Photodynamic Diagnosis and Therapy in Clinical Practice*. 2006. Brixen, Italy.
337. Maugain E, Sasnouski S, Zorin V, Merlin JL, Guillemain F, and Bezdetnaya L. Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes. *Oncol Rep*, 2004; **12**(3): 639-45.
338. Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, and Stewart FA. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer*, 2003; **88**(2): 283-90.
339. Borle F, Radu A, Fontolliet C, van den Bergh H, Monnier P, and Wagnieres G. Selectivity of the photosensitizer Tookad for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model. *Br J Cancer*, 2003; **89**(12): 2320-6.
340. Tremblay A, Leroy S, Freitag L, Copin MC, Brun PH, and Marquette CH. Endobronchial phototoxicity of WST 09 (Tookad), a new fast-acting photosensitizer for photodynamic therapy: preclinical study in the pig. *Photochem Photobiol*, 2003; **78**(2): 124-30.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

341. Chen B, Roskams T, and de Witte PA. Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2002; **76**(5): 509-13.
342. Chen B, Roskams T, Xu Y, Agostinis P, and de Witte PA. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer*, 2002; **98**(2): 284-90.
343. Fingar VH, Kik PK, Haydon PS, Cerrito PB, Tseng M, Abang E, and Wieman TJ. Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD). *Br J Cancer*, 1999; **79**(11-12): 1702-8.
344. Henderson BW, Sitnik-Busch TM, and Vaughan LA. Potentiation of photodynamic therapy antitumor activity in mice by nitric oxide synthase inhibition is fluence rate dependent. *Photochem Photobiol*, 1999; **70**(1): 64-71.
345. Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, and Morgan J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines the inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res*, 2004; **64**(6): 2120-6.
346. Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, Namba Y, and Oku N. Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta*, 2005; **1669**(1): 69-74.
347. Maeda N, Miyazawa S, Shimizu K, Asai T, Yonezawa S, Kitazawa S, Namba Y, Tsukada H, and Oku N. Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs. *Biol Pharm Bull*, 2006; **29**(9): 1936-40.
348. Perret GY, Starzec A, Hauet N, Vergote J, Le Pecheur M, Vassy R, Leger G, Verbeke KA, Bormans G, Nicolas P, Verbruggen AM, and Moretti JL. In vitro evaluation and biodistribution of a <sup>99m</sup>Tc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1. *Nucl Med Biol*, 2004; **31**(5): 575-81.
349. Starzec A, Vassy R, Martin A, Lecouvey M, Di Benedetto M, Crepin M, and Perret GY. Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci*, 2006; **79**(25): 2370-81.
350. Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, Viriot ML, Guillemin F, and Barberi-Heyob M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release*, 2006; **111**(1-2): 153-64.
351. Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, Michaud NA, Gragoudas ES, and Miller JW. Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch Ophthalmol*, 2004; **122**(7): 1002-11.
352. Mayo GL, Melendez RF, Kumar N, McKinnon SJ, and Glickman RD. Antibody-targeted photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol*, 2003; **136**(6): 1151-2.
353. Ferrario A, Fisher AM, Rucker N, and Gomer CJ. Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing in vitro apoptosis and decreasing in vivo inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res*, 2005; **65**(20): 9473-8.
354. Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg*, 1996; **14**(5): 329-34.
355. Kick G, Messer G, Goetz A, Plewig G, and Kind P. Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res*, 1995; **55**(11): 2373-9.
356. Matroule JY, Volanti C, and Piette J. NF-kappaB in Photodynamic Therapy: Discrepancies of a Master Regulator. *Photochem Photobiol*, 2006.
357. de Vree WJ, Essers MC, Koster JF, and Sluiter W. Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors. *Cancer Res*, 1997; **57**(13): 2555-8.
358. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L, Wang WC, Unger E, and Henderson BW. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer*, 2003; **88**(11): 1772-9.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

359. Krosli G, Korbelik M, and Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer*, 1995; **71**(3): 549-55.
360. Henderson BW. Photodynamic therapy--coming of age. *Photodermatol*, 1989; **6**(5): 200-11.
361. Yamamoto N, Ngwenya BZ, Sery TW, and Pieringer RA. Activation of macrophages by ether analogues of lysophospholipids. *Cancer Immunol Immunother*, 1987; **25**(3): 185-92.
362. Korbelik M and Cecic I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Lett*, 1999; **137**(1): 91-8.
363. Yamamoto N, Sery TW, Hooper JK, Willett NP, and Lindsay DD. Effectiveness of photofrin II in activation of macrophages and in vitro killing of retinoblastoma cells. *Photochem Photobiol*, 1994; **60**(2): 160-4.
364. Coutier S, Bezdetnaya L, Marchal S, Melnikova V, Belitchenko I, Merlin JL, and Guillemin F. Foscan (mTHPC) photosensitized macrophage activation: enhancement of phagocytosis, nitric oxide release and tumour necrosis factor-alpha-mediated cytolytic activity. *Br J Cancer*, 1999; **81**(1): 37-42.
365. Germain RN. Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing, Ia-restricted antigen presentation, and a separate nonspecific 2nd signal. *J Immunol*, 1981; **127**(5): 1964-6.
366. Gomer CJ, Ferrario A, and Murphree AL. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. *Br J Cancer*, 1987; **56**(1): 27-32.
367. van Hillegersberg R, Hekking-Weijma JM, Wilson JH, Edixhoven-Bosdijk A, and Kort WJ. Adjuvant intraoperative photodynamic therapy diminishes the rate of local recurrence in a rat mammary tumour model. *Br J Cancer*, 1995; **71**(4): 733-7.
368. Schreiber S, Gross S, Brandis A, Harmelin A, Rosenbach-Belkin V, Scherz A, and Salomon Y. Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *Int J Cancer*, 2002; **99**(2): 279-85.
369. Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, and Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res*, 1999; **5**(6): 1369-79.
370. Canti G, Lattuada D, Nicolini A, Taroni P, Valentini G, and Cubeddu R. Antitumor immunity induced by photodynamic therapy with aluminum disulfonated phthalocyanines and laser light. *Anticancer Drugs*, 1994; **5**(4): 443-7.
371. Korbelik M, Krosli G, Krosli J, and Dougherty GJ. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res*, 1996; **56**(24): 5647-52.
372. Korbelik M and Dougherty GJ. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res*, 1999; **59**(8): 1941-6.
373. Taraboletti G and Giavazzi R. Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer*, 2004; **40**(6): 881-9.
374. Alessandri G, Chirivi RG, Fiorentini S, Dossi R, Bonardelli S, Giulini SM, Zanetta G, Landoni F, Graziotti PP, Turano A, Caruso A, Zardi L, Giavazzi R, and Bani MR. Phenotypic and functional characteristics of tumour-derived microvascular endothelial cells. *Clin Exp Metastasis*, 1999; **17**(8): 655-62.
375. Kolonin M, Pasqualini R, and Arap W. Molecular addresses in blood vessels as targets for therapy. *Curr Opin Chem Biol*, 2001; **5**(3): 308-13.
376. Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, and Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Pathol*, 2004; **85**(5): 233-48.
377. Benelli R and Albini A. In vitro models of angiogenesis: the use of Matrigel. *Int J Biol Markers*, 1999; **14**(4): 243-6.
378. Nicosia RF, Lin YJ, Hazelton D, and Qian X. Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Pathol*, 1997; **151**(5): 1379-86.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

379. Ribatti D and Vacca A. Models for studying angiogenesis in vivo. *Int J Biol Markers*, 1999; **14**(4): 207-13.
380. Hasan J, Shnyder SD, Bibby M, Double JA, Bicknel R, and Jayson GC. Quantitative angiogenesis assays in vivo—a review. *Angiogenesis*, 2004; **7**(1): 1-16.
381. Holzer MP, Solomon KD, Vroman DT, Sandoval HP, Margaron P, Kasper TJ, and Crosson CE. Photodynamic therapy with verteporfin in a rabbit model of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003; **44**(7): 2954-8.
382. Brown EB, Campbell RB, Tsuzuki Y, Xu L, Carmeliet P, Fukumura D, and Jain RK. In vivo measurement of gene expression, angiogenesis and physiological function in tumors using multiphoton laser scanning microscopy. *Nat Med*, 2001; **7**(7): 864-8.
383. Norrby K, Jakobsson A, and Sorbo J. Quantitative angiogenesis in spreads of intact rat mesenteric windows. *Microvasc Res*, 1990; **39**(3): 341-8.
384. Guilbaud N, Kraus-Berthier L, Meyer-Losic F, Malivet V, Chacun C, Jan M, Tillequin F, Michel S, Koch M, Pfeiffer B, Atassi G, Hickman J, and Pierre A. Marked antitumor activity of a new potent acronycine derivative in orthotopic models of human solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2001; **7**(8): 2573-80.
385. Fukumura D, Yuan F, Monsky WL, Chen Y, and Jain RK. Effect of host microenvironment on the microcirculation of human colon adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 1997; **151**(3): 679-88.
386. Hoffman R. Green fluorescent protein imaging of tumour growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. *Lancet Oncol*, 2002; **3**(9): 546-56.
387. Yang M, Baranov E, Li XM, Wang JW, Jiang P, Li L, Moossa AR, Penman S, and Hoffman RM. Whole-body and intravital optical imaging of angiogenesis in orthotopically implanted tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; **98**(5): 2616-21.
388. Coralli C, Cemazar M, Kanthou C, Tozer GM, and Dachs GU. Limitations of the reporter green fluorescent protein under simulated tumor conditions. *Cancer Res*, 2001; **61**(12): 4784-90.
389. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, Olomu AB, Zhang W, Cao Y, Negrin RS, and Contag CH. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999; **96**(21): 12044-9.
390. Vooijs M, Jonkers J, Lyons S, and Berns A. Noninvasive imaging of spontaneous retinoblastoma pathway-dependent tumors in mice. *Cancer Res*, 2002; **62**(6): 1862-7.
391. Rehemtulla A, Stegman LD, Cardozo SJ, Gupta S, Hall DE, Contag CH, and Ross BD. Rapid and quantitative assessment of cancer treatment response using in vivo bioluminescence imaging. *Neoplasia*, 2000; **2**(6): 491-5.
392. Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, and Thrall JH. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst*, 2005; **97**(3): 172-87.
393. Marks PV, Belchetz PE, Saxena A, Igbasimokumo U, Thomson S, Nelson M, Stringer MR, Holroyd JA, and Brown SB. Effect of photodynamic therapy on recurrent pituitary adenomas: clinical phase I/II trial—an early report. *Br J Neurosurg*, 2000; **14**(4): 317-25.
394. Ji Y, Powers SK, Brown JT, Walstad D, and Maliner L. Toxicity of photodynamic therapy with photofrin in the normal rat brain. *Lasers Surg Med*, 1994; **14**(3): 219-28.
395. Ji Y, Walstad D, Brown JT, and Powers SK. Improved survival from intracavitary photodynamic therapy of rat glioma. *Photochem Photobiol*, 1992; **56**(3): 385-90.
396. Powers SK, Cush SS, Walstad DL, and Kwock L. Stereotactic intratumoral photodynamic therapy for recurrent malignant brain tumors. *Neurosurgery*, 1991; **29**(5): 688-95; discussion 695-6.
397. Schaffer M, Schaffer PM, Vogesser M, Ertl-Wagner B, Rauch J, Oberneder R, Jori G, Hofstetter A, and Duhmke E. Application of Photofrin II as a specific radiosensitising agent in patients with bladder cancer—a report of two cases. *Photochem Photobiol Sci*, 2002; **1**(9): 686-9.
398. Koudinova NV, Pinthus JH, Brandis A, Brenner O, Bendel P, Ramon J, Eshhar Z, Scherz A, and Salomon Y. Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int J Cancer*, 2003; **104**(6): 782-9.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

399. Leahy MJ, de Mul FF, Nilsson GE, and Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technol Health Care*, 1999; **7**(2-3): 143-62.
400. Engbrecht BW, Menon C, Kachur AV, Hahn SM, and Fraker DL. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res*, 1999; **59**(17): 4334-42.
401. Wang I, Andersson-Engels S, Nilsson GE, Wardell K, and Svanberg K. Superficial blood flow following photodynamic therapy of malignant non-melanoma skin tumours measured by laser Doppler perfusion imaging. *Br J Dermatol*, 1997; **136**(2): 184-9.
402. van den Boogert J, van Staveren HJ, de Bruin RW, Siersema PD, and van Hillegersberg R. Fractionated illumination for oesophageal ALA-PDT: effect on blood flow and PpIX formation. *Lasers Med Sci*, 2001; **16**(1): 16-25.
403. Palsson S, Gustafsson L, Bendsoe N, Soto Thompson M, Andersson-Engels S, and Svanberg K. Kinetics of the superficial perfusion and temperature in connection with photodynamic therapy of basal cell carcinomas using esterified and non-esterified 5-aminolaevulinic acid. *Br J Dermatol*, 2003; **148**(6): 1179-88.
404. Jiang L, Gu Y, Li X, Zhao X, Li J, Wang K, Liang J, Pan Y, and Zhang Y. Changes of skin perfusion after photodynamic therapy for port wine stain. *Chin Med J (Engl)*, 1998; **111**(2): 136-8.
405. Pogue BW, O'Hara JA, Demidenko E, Wilmot CM, Goodwin IA, Chen B, Swartz HM, and Hasan T. Photodynamic therapy with verteporfin in the radiation-induced fibrosarcoma-1 tumor causes enhanced radiation sensitivity. *Cancer Res*, 2003; **63**(5): 1025-33.
406. Chen B, Pogue BW, Goodwin IA, O'Hara JA, Wilmot CM, Hutchins JE, Hoopes PJ, and Hasan T. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor. *Radiat Res*, 2003; **160**(4): 452-9.
407. Yu G, Durduran T, Zhou C, Wang HW, Putt ME, Saunders HM, Sehgal CM, Glatstein E, Yodh AG, and Busch TM. Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res*, 2005; **11**(9): 3543-52.
408. Yu G, Durduran T, Zhou C, Zhu TC, Finlay JC, Busch TM, Malkowicz SB, Hahn SM, and Yodh AG. Real-time In Situ Monitoring of Human Prostate Photodynamic Therapy with Diffuse Light. *Photochem Photobiol*, 2006.
409. Busch TM. Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*, 2006; **38**(5): 494-9.
410. Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg-van den Heuvel A, Sterenberg HJ, and Robinson DJ. Laser speckle imaging of dynamic changes in flow during photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*, 2006; **21**(4): 208-12.
411. Smith TK, Choi B, Ramirez-San-Juan JC, Nelson JS, Osann K, and Kelly KM. Microvascular blood flow dynamics associated with photodynamic therapy, pulsed dye laser irradiation and combined regimens. *Lasers Surg Med*, 2006; **38**(5): 532-9.
412. Briers JD. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol Meas*, 2001; **22**(4): R35-66.
413. Gallez B, Baudelet C, and Jordan BF. Assessment of tumor oxygenation by electron paramagnetic resonance: principles and applications. *NMR Biomed*, 2004; **17**(5): 240-62.
414. Griffiths JR and Robinson SP. The OxyLite: a fibre-optic oxygen sensor. *Br J Radiol*, 1999; **72**(859): 627-30.
415. Schouwink H, Oppelaar H, Ruevekamp M, van der Valk M, Hart G, Rijken P, Baas P, and Stewart FA. Oxygen depletion during and after mTHPC-mediated photodynamic therapy in RIF1 and H-MESO1 tumors. *Radiat Res*, 2003; **159**(2): 190-8.
416. Chen B, Ahmed B, Landuyt W, Ni Y, Gaspar R, Roskams T, and de Witte PA. Potentiation of photodynamic therapy with hypericin by mitomycin C in the radiation-induced fibrosarcoma-1 mouse tumor model. *Photochem Photobiol*, 2003; **78**(3): 278-82.



## Partie VII : Références bibliographiques

---

417. Huang Z, Chen Q, Trncic N, LaRue SM, Brun PH, Wilson BC, Shapiro H, and Hetzel FW. Effects of Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD)-mediated photodynamic therapy on canine prostate pretreated with ionizing radiation. *Radiat Res*, 2004; **161**(6): 723-31.
418. Raleigh JA, Chou SC, Arteel GE, and Horsman MR. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiat Res*, 1999; **151**(5): 580-9.
419. Pinel S, Conséquences de l'érythropoïétine recombinante humaine sur l'hypoxie tumorale et l'efficacité de la radiothérapie sur deux gliomes malins humains xénotransplantés., in *Université Henri Poincaré-Nancy I*. 2004.
420. Busch TM, Hahn SM, Evans SM, and Koch CJ. Depletion of tumor oxygenation during photodynamic therapy: detection by the hypoxia marker EF3 [2-(2-nitroimidazol-1[H]-yl)-N-(3,3,3-trifluoropropyl)acetamide]. *Cancer Res*, 2000; **60**(10): 2636-42.
421. Busch TM, Wileyto EP, Emanuele MJ, Del Piero F, Marconato L, Glatstein E, and Koch CJ. Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen. *Cancer Res*, 2002; **62**(24): 7273-9.
422. Foo SS, Abbott DF, Lawrentschuk N, and Scott AM. Functional imaging of intratumoral hypoxia. *Mol Imaging Biol*, 2004; **6**(5): 291-305.
423. Gallez B, Jordan BF, Baudelet C, and Misson PD. Pharmacological modifications of the partial pressure of oxygen in murine tumors: evaluation using in vivo EPR oximetry. *Magn Reson Med*, 1999; **42**(4): 627-30.
424. Swartz HM and Clarkson RB. The measurement of oxygen in vivo using EPR techniques. *Phys Med Biol*, 1998; **43**(7): 1957-75.
425. Pogue BW, O'Hara JA, Goodwin IA, Wilmot CJ, Fournier GP, Akay AR, and Swartz H. Tumor PO(2) changes during photodynamic therapy depend upon photosensitizer type and time after injection. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2002; **132**(1): 177-84.
426. Tournaire R, Demangel C, Derbin C, Perret G, Mazie J-C, Plouet J, and Vassy R. Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof. 2001.
427. Kostenich G, Livnah N, Bonasera TA, Yechezkel T, Salitra Y, Litman P, Kimel S, and Orenstein A. Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin. *Lung Cancer*, 2005.
428. Engel A, Chatterjee SK, Al-Arifi A, and Nuhn P. Influence of spacer length on the agglutination of glycolipid-incorporated liposomes by ConA as model membrane. *J Pharm Sci*, 2003; **92**(11): 2229-35.
429. Merrifield RB. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 1963; **85**:2149-??
430. Carpino LA and Han GY. The 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoprotecting group. *J Org Chem*, 1972; **37**:3404.
431. Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, and Gillessen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Lett*, 1989; **30**:1927-30.
432. Tirand L, Thomas N, Dodeller M, Dumas D, Frochot C, Maunit B, Guillemin F, and Barberi-Heyob M. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an *in vivo* and *in vitro* study. *Drug Metab Dispos*, 2007; sous correction.
433. Figueiredo T, Johnstone R, SantAna Sørensen A, Burget D, and Jacques P. Determination of Fluorescence Yields, Singlet Lifetimes and Singlet Oxygen Yields of Water-Insoluble Porphyrins and Metalloporphyrins in Organic Solvents and in Aqueous Media. *Photochem Photobiol*, 1999; **69**(5): 517-28.
434. DeRosa MC and Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 2002; **233-234**:351/371.
435. Schmidt R and Afshari E. Comment on "Effect of solvent on the phosphorescence rate constant of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g)". *J Phys Chem*, 1990; **94**(10): 4377-4378.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

436. Xu C and Webb WW. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J Opt Soc Am B*, 1996; **13**(3).
437. Werts MH, Nerambourg N, Pelegry D, Grand YL, and Blanchard-Desce M. Action cross sections of two-photon excited luminescence of some Eu(III) and Tb(III) complexes. *Photochem Photobiol Sci*, 2005; **4**(7): 531-8.
438. Frochot C, Di Stasio B, Vanderesse R, Belgy MJ, Dodeller M, Guillemin F, Viriot ML, and Barberi-Heyob M. Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg Chem*, 2007; in press.
439. De Luca S, Tesauro D, Di Lello P, Fattorusso R, Saviano M, Pedone C, and Morelli GJ. Synthesis and Solution Characterization of a Porphyrine-CCK8 conjugate. *Peptide Sci*, 2001; 7386-94.
440. Chaleix V, Sol V, Huang YM, Guilloton M, Granet R, Blais JC, and Krausz P. RGD-porphyrin conjugates: Synthesis and potential application in photodynamic therapy. *Eur J Org Chem*, 2003; 81486-93.
441. Walker I, Vernon DI, and Brown SB. The solid-phase conjugation of purpurin-18 with a synthetic targeting peptide. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004; **14**(2): 441-3.
442. Liu J, Zhao YW, Zhao JQ, Xia AD, Jiang LJ, Wu S, Ma L, Dong YQ, and Gu YH. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, 2002; **68**(2-3): 156-64.
443. Karotki A, Khurana M, Lepock JR, and Wilson BC. Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 2006; **82**(2): 443-52.
444. Drobizhev M, Stepanenko Y, Dzenis Y, Karotki A, Rebane A, Taylor PN, and Anderson HL. Extremely strong near-IR two-photon absorption in conjugated porphyrin dimers: quantitative description with three-essential-states model. *J Phys Chem B Condens Matter Mater Surf Interfaces Biophys*, 2005; **109**(15): 7223-36.
445. Ogawa K, Hasegawa H, Inaba Y, Kobuke Y, Inouye H, Kanemitsu Y, Kohno E, Hirano T, Ogura S, and Okura I. Water-soluble bis(imidazolylporphyrin) self-assemblies with large two-photon absorption cross sections as potential agents for photodynamic therapy. *J Med Chem*, 2006; **49**(7): 2276-83.
446. Pinel S, Barberi-Heyob M, Cohen-Jonathan E, Merlin JL, Delmas C, Plenat F, and Chastagner P. Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2004; **59**(1): 250-9.
447. Ferrario A, von Tiehl KF, Rucker N, Schwarz MA, Gill PS, and Gomer CJ. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer Res*, 2000; **60**(15): 4066-9.
448. Jones HJ, Vernon DI, and Brown SB. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer*, 2003; **89**(2): 398-404.
449. Mordon SR, Wassmer B, and Zemmouri J. Mathematical modeling of endovenous laser treatment (ELT). *Biomed Eng Online*, 2006; 526.
450. Uehara M, Inokuchi T, Sano K, and ZuoLin W. Expression of vascular endothelial growth factor in mouse tumours subjected to photodynamic therapy. *Eur J Cancer*, 2001; **37**(16): 2111-5.
451. Jiang F, Zhang ZG, Katakowski M, Robin AM, Faber M, Zhang F, and Chopp M. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. *Photochem Photobiol*, 2004; **79**(6): 494-8.
452. Zhang X, Jiang F, Zhang ZG, Kalkanis SN, Hong X, Decarvalho AC, Chen J, Yang H, Robin AM, and Chopp M. Low-dose photodynamic therapy increases endothelial cell proliferation and VEGF expression in nude mice brain. *Lasers Med Sci*, 2005; **20**(2): 74-9.
453. Ferrario A, Von Tiehl K, Wong S, Luna M, and Gomer CJ. Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response. *Cancer Res*, 2002; **62**(14): 3956-61.
454. Ferrario A, Chantrain CF, von Tiehl K, Buckley S, Rucker N, Shalinsky DR, Shimada H, DeClerck YA, and Gomer CJ. The matrix metalloproteinase inhibitor prinomastat enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse tumor model. *Cancer Res*, 2004; **64**(7): 2328-32.

## Partie VII : Références bibliographiques

---

455. Coutier S, Bezdetnaya LN, Foster TH, Parache RM, and Guillemin F. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res*, 2002; **158**(3): 339-45.
456. Dysart JS, Singh G, and Patterson MS. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochem Photobiol*, 2005; **81**(1): 196-205.
457. Niedre MJ, Yu CS, Patterson MS, and Wilson BC. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br J Cancer*, 2005.
458. Jarvi M, Niedre M, Patterson M, and Wilson B. Singlet Oxygen Luminescence Dosimetry (SOLD) for Photodynamic Therapy: Current Status, Challenges and Future Prospects. *Photochem Photobiol*, 2006.
459. Dysart JS, Singh G, and Patterson MS. Calculation of Singlet Oxygen Dose from Photosensitizer Fluorescence and Photobleaching During mTHPC Photodynamic Therapy of MLL Cells. *Photochem Photobiol*, 2004.
460. Mansour M, Amri D, Bouttefroy A, Linder M, and Milliere JB. Inhibition of *Bacillus licheniformis* spore growth in milk by nisin, monolaurin, and pH combinations. *J Appl Microbiol*, 1999; **86**(2): 311-24.
461. Adolphe Y, Jacquot M, Linder M, Revol-Junelles AM, and Milliere JB. Optimization of the components concentrations of the lactoperoxidase system by RSM. *J Appl Microbiol*, 2006; **100**(5): 1034-42.
462. Singh B, Kumar R, and Ahuja N. Optimizing drug delivery systems using systematic "design of experiments." Part I: fundamental aspects. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2005; **22**(1): 27-105.
463. Carter WH, Jr. and Wampler GL. Review of the application of response surface methodology in the combination therapy of cancer. *Cancer Treat Rep*, 1986; **70**(1): 133-40.
464. Doehlert DH. Uniform shell designs. *Appl Stat*, 1970; **19**:231-9.
465. Tabatabai M, Williams DK, and Bursac Z. Hyperbolic growth models: theory and application. *Theor Biol Med Model*, 2005; **2**(1): 14.
466. Bellnier DA, Gollnick SO, Camacho SH, Greco WR, and Cheney RT. Treatment with the tumor necrosis factor-alpha-inducing drug 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid enhances the antitumor activity of the photodynamic therapy of RIF-1 mouse tumors. *Cancer Res*, 2003; **63**(22): 7584-90.
467. Seshadri M, Spornyak JA, Mazurchuk R, Camacho SH, Oseroff AR, Cheney RT, and Bellnier DA. Tumor vascular response to photodynamic therapy and the antivascular agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid: implications for combination therapy. *Clin Cancer Res*, 2005; **11**(11): 4241-50.
468. Dolmans DE, Kadambi A, Hill JS, Waters CA, Robinson BC, Walker JP, Fukumura D, and Jain RK. Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy. *Cancer Res*, 2002; **62**(7): 2151-6.
469. Kosharsky B, Solban N, Chang SK, Rizvi I, Chang Y, and Hasan T. A mechanism-based combination therapy reduces local tumor growth and metastasis in an orthotopic model of prostate cancer. *Cancer Res*, 2006; **66**(22): 10953-8.
470. Snyder JW, Greco WR, Bellnier DA, Vaughan L, and Henderson BW. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. *Cancer Res*, 2003; **63**(23): 8126-31.
471. Boyle RG and Travers S. Hypoxia: targeting the tumour. *Anticancer Agents Med Chem*, 2006; **6**(4): 281-6.
472. Bremner JC, Adams GE, Pearson JK, Sansom JM, Stratford IJ, Bedwell J, Bown SG, MacRobert AJ, and Phillips D. Increasing the effect of photodynamic therapy on the RIF-1 murine sarcoma, using the bioreductive drugs RSU1069 and RB6145. *Br J Cancer*, 1992; **66**(6): 1070-6.