Nancy-Université
Université Henri Poincaré

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

➢ Contact SCD Nancy 1 : theses.sciences@scd.uhp-nancy.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université

Sigreto EA 4421 SIGNALISATION GENOMIQUE ET RECHERCHE TRANSLATIONNELLE EN ONCOLOGIE

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE

Mention : « Sciences de la vie et de la Santé »

par **Valérie JOUAN-HUREAUX**

LES THERAPIES CIBLEES ANTI-EGFR ONT-ELLES UN REEL EFFET ANTI-ANGIOGENIQUE ? ETUDE *IN VITRO* DE L'ANGIOGENESE INDUITE PAR DES CELLULES CANCEREUSES DES VADS TRAITEES PAR LE CETUXIMAB.

Le 21 Décembre 2011

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mr. Philippe NGUYEN	PU-PH, CHU - Reims.
	Mr. Gilles PAGES	DR, CNRS UMR 6543 - Nice.
Examinateur :	Mr. Andréas BIKFALVI	PU, INSERM U1029 – Bordeaux.
	Mr. François PLENAT	PU/PH, EA 4421 SiGReTO – Nancy.
	Mme Béatrice FAIVRE	MCU/HDR, EA 4421 SiGReTO, Directeur de thèse.
	Mr. Cédric BOURA	MCU, EA 4421 SiGReTO, Co-directeur de thèse.

À Julien et à Denis,

À mes parents et à ma sœur,

À toute ma famille,

À mes amis,

À la mémoire de ma grand-mère Yvonne.

Dvorak 1986 :

La tumeur est une plaie qui ne guérit pas

« wounds that do not heal ».

Remerciements

*En premier lieu, je tiens à remercier le professeur **Philippe Nguyen** et le docteur **Gilles Pages** pour avoir consacré un peu de leur temps à l'évaluation de ce travail de thèse, qu'ils trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.*

*Je remercie vivement le professeur **Andréas Bikfalvi** pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je suis honorée par votre présence et vous exprime toute ma gratitude pour m'avoir initiée à « la recherche » il a y déjà 13 ans de cela…*

*J'exprime également ma reconnaissance à M. **Jean-Louis Merlin** pour avoir encadré ma première année de thèse et pour son implication dans la rédaction du premier article.*

*Je remercie également le professeur **François Plénat** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et qui m'a fait l'honneur d'accepter de participer au jury de ma thèse, merci pour votre soutient…*

*Je souhaite remercier les **différents responsables de la plateforme Nancytomique** (CHU-Nancy Brabois) pour m'avoir permis l'accès aux différents équipements (Navios, Amnis).*

*Je voudrais également remercier Mme **Stéphanie Hesse** et M. **Eric Perspicace** pour m'avoir confié l'évaluation de leurs molécules anti-VEGFR-2. Ce fut un réel plaisir de collaborer avec vous et un réel bonheur d'étudier l'efficacité de telles molécules, cela change des anti-EGFR !*

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux, les différents stagiaires que j'ai eu à encadrer, le labo d'à coté, pour les dépannages, Denise du service d'anapathologie du CHU-Nancy Brabois pour les essais de microscopie électronique, Carole du CAV pour les dosages en Bioplex… Je tiens à remercier tout particulièrement :

*- M. **Julien Perrin** pour son aide concernant l'agrégation plaquettaire,*

*- Mme **Marie Toussaint-Hacquard** pour son aide concernant la thrombinographie,*

*- Mme **Véronique Latger-Cannard** pour son aide dans l'établissement du protocole de détection des MP,*

*- M. **Frédéric Massin** pour m'avoir formé à l'utilisation du cytomètre en flux et à Melle Sandra son aide dans les expérimentations d'imagerie en flux.*

*Merci également aux « **gentilles fifilles de l'ancien labo** », Géraldine et Isabelle pour leur bonne humeur et leur sympathie.*

*Mes remerciements vont également à **mes collègues du laboratoire EA-SiGReTO** pour leur soutien et leurs encouragements : M. Plénat, Dominique, Sophie, Jihane, Alicia, Sabine et Marie-claire. Merci également à l'équipe de M. Bécuwe pour leur sympathie et pour m'avoir permis d'utiliser leurs équipements.*

*J'ai une pensée particulière pour M. **Patrick Menu** et Mme **Pascale Dewachter**, deux personnes à l'origine de mon inscription en doctorat. Je ne sais pas si je dois vous remercier de m'y avoir poussée… mais merci de votre confiance.*

*Merci à toi **Cédric**, et à toi **Béatrice** pour avoir encadré ce travail de thèse pendant toutes ces années et votre aide précieuse dans l'élaboration de ce document. Une thèse en deux mois, ce n'est sans doute pas un record mais quand même ! J'espère que ce n'est pas une fin mais le début d'une grande aventure...*

*Enfin, un très très très ... grand merci à la **météo de cet été 2011** grâce à laquelle écrire une thèse devient un réel plaisir et n'est pas devenue une source de frustration.*

Liste des abréviations

3D-QSAR	3D-quantitative structure activity relationship
ADAM	A-disintegrin and metalloprotease
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
Akt	serine threonine protein kinase B (ou PKB)
AMC	7-amino-4-methylcoumarin (fluorophore)
AMM	autorisation de mise sur le marché
Ang-1	angiopoïétine-1
Ang-2	angiopoïétine-2
ANK	ankyrine
APC	allophycocyanin (fluorophore)
AP-1	activating protein 1
ARF-6	ADP-ribosylation factor 6
ARNm	acide ribonucléique messager
ARNmi	microARN
APS	ammonium persulfate
ATP	adénosine triphosphate
BCA	bicinchoninic acid
BSA	sérum albumine bovine
BPA	Bioplex® Protein Assay
C2 / C20	2 ou 20 µg/mL de cetuximab
Ca	Calcium
CAM	cellular adhesion molecule
CD	cluster de différenciation
CDK	cyclin dependent kinase
CE	cellules endothéliales
CEC	cellules endothéliales circulantes
CEP	progéniteurs de cellules endothéliales
CHU	centre hospitalo-universitaire
CML	cellules musculaires lisses
CM	milieux conditonnés
CM-Cal27	milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27
CM-FaDu	milieux conditionnés issus de la culture des cellules FaDu
CO_2	dioxyde de carbone
Co-A	co-activateur de la transcription
Co-R	co-répresseur de la transcription
DAPI	marqueur des noyaux (fluorescence)
Dll4	delta-like ligand-4 (ligand de notch)
DLS	diffusion dynamique de la lumière
DSL	delta/Serrate/LAG-2 (partie du domaine extracellulaire du ligand de notch)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	dimethlysulfoxide
ED50	concentration de demi efficacité
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique

EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGFR-TKI	inhibiteur de l'activité tyrosine kinase d'EGFR
EMMPRIN	extracellular matrix metalloproteinase inducer
EpHB4	EphrineB4
EPO	érythropoïétine
EPS4	tartrate de thiénopyrimidinone
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EPS4	tartrate de thiénopyrimidinone
ETP	endogenous thrombin potential
FAK	focal adhesion kinase
FAS-L	ligand de FAS
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	récepteur du FGF
FITC	fluorescein isothiocyanate (Fluorophore)
Flk-1	fetal liver-kinase 1, gène codant pour VEGFR-2 chez la souris
Flt-1	fms-like tyrosine kinase-1 : gène codant pour VEGFR-1
FMI	fluorescence mean intensity
Foxo	facteur de transcription forkhead
FSC	forward scatter collection
FT	facteur tissulaire
GAG	glycosaminoglycane
GIST	gastro-intestinal stromal tumor.
GM-CSF	granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GTPases	guanosine triphosphate hydrolase
HAT	histone acetyl transferase
HBSS	Hank's balanced salts solution
HD	domaine d'héterodimerisation
HDAC	histone deacetylase
HER	human epidermal growth factor receptor
HGF	hepatocyte growthfactor
HIF	hypoxia inducible factor
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HRE	hypoxia responsive element
HRP	horseradish peroxidase
HS	heparane sulfate
HSPG	protéoglycane à héparane sulfate
HTA	hypertension artérielle
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM	inter-cellular adhesion molecule
IGF	insulin -like growth factor
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) Receptor
IgG	Immunoglobuline G
IL	interleukine (-1, -4, -8,…)
IP3	inositol triphosphate
ISTH	comité international de standardisation scientifique

ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (partie du domaine intracellulaire de PECAM)
JAG	jagged (ligand de notch)
JAK	janus kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kd	constante de dissociation
KDR	kinase domain containing receptor (VEGFR-2 chez l'humain).
LNR	Lin12/Notch repeats (=NRR negative regulatory region)
LPA	acide lysophosphatidique
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MB	membrane basale
MCP-1	monocytes chemotactic protein 1
MEC	matrice extra-cellulaire
MEK	MAP kinase kinase
MLCK2	myosin light chain kinase-2
MMP	matrix metalloprotease
MP	microparticule
MT-MMP	membrane-type matrix metalloproteinase
mTOR	mammalian target of rapamycin
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5 diphényltétrazolium
MV	microvésicules
NaCl	chlorure de sodium
NECD	notch extracellular domain
NEXT	notch extracellular truncation
NFκB	nuclear factor kappa B
NICD	notch intracellular domain)
NK	natural killer
NLS	nuclear localization signals
NO	nitric oxide (monoxyde d'azote)
NOS	nitric oxide synthase
NRP-1 ou -2	neuropiline-1 ou -2
O	oxygène
P2 / P20	2 ou 20 µg/mL de panitumumab
PA	plasminogen activator
PAF	paraformaldéhyde
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAI	plasminogen activaton inhibitor
PBS	phosphate buffer saline
PC	phosphatidyl choline
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PDFGR	Platelet Derived Growth Factor Receptor

PdI	indice de polydispersité
PE	phosphatyléthanolamine (lipide)
PE	phycoérythrine (marqueur fluorescent)
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (ou CD-31)
pEGFR	EGFR phosphorylé
PEST	domain rich in proline (P), glutamine (E), sérine (S) and thréonine (T)
PF-4	facteur plaquettaire 4
pH	potential Hydrogène
PHD	prolyl-hydroxylase domain-containing enzyme.
PI3K	phosphoinositide 3-kinase;
PIP2	phosphatidyl inositol-diphosphate,
PIP3	phosphatidyl inositol-triphosphate,
PKA	protéine kinase A
PKB	proteine kinase B = AKT
PKC	proteine kinase C
PL	phospholipides
PLC	phospholipase C
PlGF	placenta growth factor
PLSD	protected least significant difference (test statistique)
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
PMT	photomultiplicateur
PPP	plasma pauvre en plaquette
PRP	plasma riche en plaquette
PS	phosphatidylsérine
PSLG-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PVDF	polyvinylidene fluoride
RAM	RBP-Jk associated molecule
RBPJ	recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RCP	résumé des caractéristiques du produit
RHO	Ras homolog gene family member (GTPase)
ROCK-1	kinase 1 associé à Rho
RIPA	milieu permettant de lyser les cellules (extraction protéine)
RMPI	Roswell Park Memorial Institute medium
SD	déviation standard
SDF-1	stromal-cell derived factor-1.
SDS:	sodium dodecyl sulfonate
SDS PAGE	sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
SH2:	Src homology 2
SHP	SH2 phosphatases
shRNA:	short hairpin RNA
SiRNA:	small interference RNA
SM	sphingomyéline
SR	sulfo rhodamine
Src	a proto-oncogenic tyrosine kinase
SSC	side scatter collection
STAT	signal transducer and activator of transcription

SuPAR	soluble urokinase plasminogen activator receptor
SVF	serum de veau foetal
SVFd	sérum de veau foetal déplété en microparticules
TACE	tumor necrosis factor-alpha converting enzyme
TAD	domaine de transactivation
T. Amb.	température ambiante
Tampon TBST	tris-buffered saline tween
Tampon TNE	tampon composé de Tris NaCl et EDTA
TBS	tampon Tris salin
TEMED	tetramethylethylenediamine
TF	tissue factor
asTF	alternative spliced TF
TGF	transforming growth factor
Tie-2	tunica interna endothelial cell kinase (= TEK : tunica endothelial cell kinase)
TIH	thrombocytopénie induite par l'héparine
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TKI	tyrosine kinase inhibitor
TMV	microvésicule tumorale
TNF-α	tumor necrosis factor-α
tPA	tissue plasminogen activator
TRAIL	tumor necrosis factor-(TNF) related apoptosis-inducing ligand
TSP-1	thrombospondine-1
Tyr	tyrosine (Y)
UA	unité arbitraire
UHP	université Henri Poincaré
uPA	urokinase plasminogen activator
uPAR	urokinase plasminogen activator receptor
VADS	voies aérodigestives supérieures
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VDA	vascular disrupting agent
VE-cadhérine	cadhérine endothéliale vasculaire
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor
VHL	von Hippel-Lindau
vWF	facteur de von willebrand

Liste des illustrations

Figure 1 : Coupe transversale d'un capillaire observé par microcopie électronique 3
Figure 2 : Représentation de la surface luminale de l'endothélium vasculaire..... 4
Figure 3 : Représentation schématique des fibres constituant le cytosquelette 5
Figure 4 : Interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique et la matrice extracellulaire 6
Figure 5 : Les différents isoformes du VEGF-A..... 8
Figure 6 : Les différentes voies de signalisation de VEGFR-2..... 9
Figure 7 : Structure et voie de signalisation de Notch. 10
Figure 8: Voie de recyclage du ligand de Notch. 11
Figure 9 : Structure et voie de signalisation de PECAM-1 13
Figure 10 : Représentation des différents types de jonctions..... 14
Figure 11 : Représentation de la structure moléculaire de la membrane basale 15
Figure 12 : Représentation des plaques d'adhésion focales. 16
Figure 13 : Interactions des composés de la membrane basale avec les intégrines. 17
Figure 14 : Représentation des interactions ayant lieu entre les péricytes et les CE 18
Figure 15 : Les différentes fonctions de l'endothélium vasculaire. 19
Figure 16 : Formation des vaisseaux par vasculogenèse et tubulogenèse..... 23
Figure 17 : Les différents mécanismes de tubulogenèse..... 24
Figure 18 : Représentation des différents processus de formation des vaisseaux sanguins..... 25
Figure 19 : La balance angiogénique 27
Tableau 1 : Liste des principaux facteurs pro-angiogéniques endogènes et leurs mécanismes d'action..... 28
Tableau 2 : Liste des principaux facteurs anti-angiogéniques et leurs mécanismes d'action .. 29
Tableau 3 : Tableau récapitulatif des facteurs impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse..... 31
Figure 20 : Contrôle de l'activité de HIF par la pression tissulaire en oxygène. 32
Figure 21 : Mécanisme de dégradation de HIF-1α..... 33
Figure 22 : Les cibles directes de HIF..... 34
Figure 23 : Déstabilisation de la paroi et sortie de la quiescence. 35
Figure 24 : Rôle du VEGF dans la perméabilité vasculaire. 36
Figure 25 : Représentation des voies de signalisation impliquées dans l'état de quiescence des CE..... 37
Figure 26 : Rôle des angiopoïétines dans la stabilité des vaisseaux 38
Figure 27 : Activation des MMP..... 39
Figure 28 : Représentation de l'activation des MMP à la surface des CE en phase d'invasion. 40
Figure 29 : représentation des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement 41
Figure 30 : Les différents phénotypes des CE dans un vaisseau en formation. 41
Figure 31 : Représentation du mécanisme de sélection des différents phénotypes endothéliaux. 42
Figure 32 : Expression d'Ephrine-B2 et Eph-B4 au niveau des cellules angiogéniques 43
Figure 33 : Représentation des différentes voies de signalisation du récepteur Tie 45
Tableau 4 : Les différentes molécules impliquées dans la maturation des vaisseaux et intervenant dans les interactions cellule-cellule (à gauche) ou cellule-matrice (à droite). 48
Tableau 5 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des vaisseaux. 48
Figure 34 : Représentation des phases de résolution de l'angiogenèse..... 49
Figure 35 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'intégrité vasculaire..... 50
Figure 36 : Les différents types de capillaires..... 52

Figure 37 : Les caractéristiques du cancer. 56
Figure 38 : Représentation des voies aérodigestives supérieures (VADS) 58
Figure 39 : Les différentes étapes du développement des cancers des VADS. 59
Tableau 6 : Valeurs pronostiques de différents biomarqueurs des cancers des VADS identifiés par immunohistochimie 60
Figure 40 : Les récepteurs de la famille HER et leurs ligands. 61
Figure 41 : Représentation de la voie de signalisation d'EGFR 62
Figure 42 : Représentation des motifs impliqués dans l'endocytose du récepteur EGFR. 63
Figure 43 : La cascade de la coagulation. *(Extrait du site internet de la source encyclopédie Wikipedia)* 65
Figure 44 : les facteurs impliqués dans la sur-expression du facteur tissulaire et les conséquences sur le développement tumoral. *(Extrait de Rak et al., Semin Thromb Hemost, 2006)* (139) 66
Figure 45 : Voie d'activation de l'angiogenèse tumorale par le facteur tissulaire. *(Extrait de López-Pedrera et al., Leukemia, 2006) (145).* 67
Figure 46 : Représentation de la hiérarchisation des vaisseaux normaux (à gauche) et tumoraux (à droite). 69
Figure 47 : Structure des vaisseaux tumoraux. 69
Figure 48 : Schéma représentant les anomalies de chaque composant des vaisseaux tumoraux. 70
Figure 49 : Schéma représentant la répartition des péricytes au niveau des vaisseaux sanguins. 71
Tableau 7 : Récapitulatif de la différence entre les vaisseaux normaux et tumoraux. 71
Figure 50 : Les différents mécanismes de formation des vaisseaux spécifiques de l'angiogenèse tumorale. 72
Tableau 8 : Les différentes molécules pro-angiogéniques sécrétées par cellules tumorales. .. 74
Tableau 9 : Impact des oncogènes potentiels sur l'angiogenèse. 75
Figure 51 : Expression des différents facteurs de croissance lors de la croissance tumorale .. 76
Tableau 10 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse physiologique et tumorale 76
Figure 52 : Mécanisme de l'angiogenèse tumorale. 77
Figure 53 : Représentation des différentes cibles des thérapies ciblées anti-tumorales et leurs principaux agents thérapeutiques. 81
Tableau 11 : Récapitulatif des différentes thérapies ciblées. 82
Figure 54 : Mode d'action des molécules ciblant les récepteurs à activité tyrosine kinase. 83
Figure 55 : Les différentes cibles impliquées dans les thérapies ciblées anti-angiogéniques et leurs principaux agents. 84
Tableau 12 : Inhibiteurs direct de l'angiogenèse et leur mécanisme d'action. 85
Tableau 13 : Inhibiteurs de l'angiogenèse impliqués dans l'inhibition des récepteurs. 86
Figure 56 : Représentation des interactions entre l'ATP et le site actif du récepteur VEGFR-2. 87
Figure 57 : Ciblage thérapeutique des caractéristiques des cancers. 88
Figure 58: Représentation schématique des différentes molécules transportées par les microvésicules tumorales. 92
Tableau 14 : Composition des microvésicules tumorales. 93
Figure 59. Mécanisme de formation des microvésicules 94
Figure 60 : Représentation du mécanisme de relargage des MV. 97
Figure 61. Schéma représentatif des différents mécanismes d'interaction des MV avec les cellules cibles. 98
Figure 62 : Rôle des microvésicules dans la progression des cancers. 99

Figure 63 : Rôle des microvésicules dans le cancer 105
Figure 64 : Structure du tartrate de thiénopyrimidinone (EPS4). 116
Figure 65 : Représentation d'un hématimètre. 117
Tableau 15 : Liste des cytokines détectées par le kit « Proteome Profiler™ Array ». 120
Figure 66 : Méthode de détection des protéines sur une membrane du kit « Proteome Profiler® Array » 122
Figure 67 : Vérification de la linéarité de la technique de mesure de la viabilité (Hoechst) . 127
Figure 68 : Vérification de la linéarité de la technique de la mesure de la viabilité (Hoechst) 127
Figure 69 : Courbe de prolifération cellulaire des différents types cellulaires utilisés. 128
Tableau 16 : composition des gels de polyacrylamide (technique western blot). 133
Tableau 17 : Liste des anticorps avec leur dilution utilisés pour le western blot 135
Figure 70 : Principe de mesure de la taille des particules en suspension par DLS 137
Figure 71 : Schémas descriptif de l'appareil Zétasizer NanoZS 138
Figure 72 : Exemple d'analyse obtenue avec un contrôle de taille 139
Figure 73 : Observation des cellules FaDu marquées au DiO 141
Figure 74 : Image des lignées FaDu marquées en monocouche avec PKH67 142
Figure 75 : Représentation des données de cytométrie en flux sous-forme mono- ou bi-paramétrique (à gauche et à droite respectivement) 143
Figure 76 : Exemple d'histogramme obtenu lors de l'analyse des billes Rainbow 144
Figure 77 : Contrôle qualité du cytométrie en flux : variation des intensités des différents canaux utilisés 145
Tableau 18 : Contrôle qualité du cytométre en flux : valeurs des intensités pour chaque canal. 146
Tableau 19 : Caractéristiques et volumes des anticorps utilisés pour les immunomarquages. 146
Figure 78 : Cytométrie en flux : exemple de scatogramme obtenu lors de l'analyse des cellules. 149
Figure 79 : Cytométrie en flux : méthode de sélection des événements permettant l'analyse des microparticules 150
Figure 80 : Cytométrie en flux : représentation des marquages obtenus avec les cellules Cal27 150
Figure 81 : Cytométrie en flux : représentation des marquages obtenus avec les TMV- Cal27 151
Figure 82 : Cytométrie en flux : marquages des lignées avec le DiO 151
Figure 83 : Cytométrie en flux : représentation des marquages des TMV avec le DiO 151
Figure 84 : Principe de fonctionnement de l'Image StreamX®. 152
Figure 85 : Cytométrie en flux : essai de fusion entre les HUVEC et TMV-Cal27-DiO 153
Figure 86 : Thrombinographie : les différentes phases de génération de thrombine 155
Figure 87 : Exemple d'un thrombinogramme obtenu lors de l'analyse des milieux conditionnés : représentation des différents paramètres calculés 157
Figure 88 : Effet de VEGF sur l'activité métabolique des HUVEC 167
Figure 89 : Etude de l'effet du tartrate de thiénopyrimidinone (EPS4) sur les HUVEC : 168
Figure 90 : Effet d'EPS4 sur la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro* induite par le VEGF. 169
Figure 91 : Effet d'EPS4 sur la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro* induite par le VEGF 170
Figure 92 : Exemple de la cinétique de l'agrégation des plaquettes induite par l'ADP en présence d'EPS4 171

Figure 93 : Exemple d'agrégation des plaquettes induite par le collagène en présence d'EPS4 172
Tableau 20 : Exemple d'IC50 obtenues pour quelques molécules ciblant le domaine tyrosine kinase de VEGFR-2 174
Figure 94 : Visualisation de la thiénopyrimidinone dans la carte des interactions moléculaires avec le domaine de liaison à l'ATP de VEGFR-2 (modèle 3B-QSAR). 174
Figure 95 : Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules Cal27 et FaDu 180
Figure 96 : Effet d'EGF sur l'activité métabolique des Cal27 et des FaDu en présence de cetuximab 181
Figure 97 : Effet d'EGF sur la viabilité des cellules Cal27 et des FaDu 181
Figure 98 : Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales 182
Figure 99 : Effet du cetuximab sur la sécrétion des protéines par les cellules tumorales 183
Figure 100 : Effet du cetuximab sur la libération de VEGF par les cellules tumorales 184
Figure 101 : Analyse de l'expression de protéines impliquées dans l'angiogenèse et libérées dans les milieux conditionnés 185
Tableau 21 : Liste des molécules impliquées dans les cancers des VADS et détectées par le kit « proteome profilerTM array » 187
Figure 102 : Effet des CM sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales 189
Figure 103 : Effet de la dilution des milieux conditionnés sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC 190
Figure 104 : Effet des milieux conditionnés préparés en présence de cetuximab sur la formation des tubes pseudo-capillaires *in vitro* 192
Figure 105 : Expression d'EGFR (A), PECAM-1 (B), Notch-4 (C) et VEGFR-2 (D) par les cellules endothéliales 193
Figure 106 : Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules tumorales 195
Figure 107 : Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales 196
Figure 108 : Effet du panitumumab sur la quantité de protéines sécrétées par les cellules tumorales dans les milieux conditionnés 197
Figure 109 : Analyse de l'expression des protéines impliquées dans l'angiogenèse et libérées dans les milieux conditionnés 198
Tableau 22 : Comparaison des effets du panitumumab et du cetuximab sur la sécrétion des protéines impliquées dans l'angiogenèse 199
Figure 110 : Détection par la technique de diffusion de la lumière (DLS) des microvésicules 211
Figure 111 : Mesure de la taille des microvésicules par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) 212
Figure 112 : Détection par cytométrie en flux des microvésicules : effet du cetuximab. 213
Figure 113 : Effet du cetuximab sur la libération des TMV : analyse par cytométrie en flux 214
Figure 114 : Effet du cetuximab sur le marquage des cellules tumorales avec l'annexine-V 215
Figure 115 : Expression de l'annexine-V à la surface des TMV 216
Figure 116 : Expression d'EGFR à la surface des lignées cellulaires 217
Figure 117 : Effet du cetuximab sur l'expression d'EGFR à la surface des TMV 218
Figure 118 : Effet du cetuximab sur l'expression d'EPCAM à la surface des lignées cellulaires 219
Figure 119 : Effet du cetuximab sur l'expression de TF à la surface des lignées cellulaires 220

Figure 120 : Effet du cetuximab sur l'expression de TF à la surface des TMV : représentation de l'intensité moyenne 220
Tableau 23 : Tableau récapitulatif de l'expression d'EGFR, du TF et d'EPCAM à la surface des cellules Cal27 et FaDu et des TMV libérées par ces cellules 221
Figure 121 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie 222
Tableau 24 : Effet de l'apport global des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie 223
Figure 122 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport en PL des TMV. 224
Tableau 25 : Effet de l'apport en PL des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie. 224
Figure 123 : Effet des microvésicules tumorales dans la génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport global des TMV en PL. 224
Figure 124 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport en TF des TMV. 225
Tableau 26 : Effet de l'apport en TF des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie 225
Figure 125 : Marquage des lignées cellulaires Cal27 et FaDu au DiO 227
Figure 126 : Marquage des TMV au DiO par cytométrie en flux 228
Figure 127 : Mesure par cytométrie en flux des interactions entre les TMV et les cellules endothéliales 229
Figure 128 : Effet du temps d'incubation sur les interactions entre les TMV et les cellules endothéliales par cytométrie en flux 229
Tableau 27 : Mesure des interactions entre les TMV et les cellules HUVEC par imagerie en flux 230
Figure 129 : Mesure par imagerie en flux des interactions entre les TMV et les cellules endothéliales 231
Figure 130 : Etude par imagerie en flux de l'effet du cetuximab sur les interactions entre les TMV et les cellules endothéliales 232
Figure 131 : Observation par imagerie en flux des HUVEC après 24 heures d'incubation avec les milieux conditionnés contenant les TMV marquées au DiO. 233

Liste des publications

Publication Internationale:

V. Jouan, X. Canron, M. Alemany, JP. Caen, G. Quentin, J. Plouet and A. Bikfalvi. Inhibition of *in vitro* angiogenesis by platelet factor-4 derived peptides and mechanism of action. Blood, Vol 94, N° 3 (August 1), 1999 : 984-993.

A.Ayalew, PY.Marie, P.Menu, PM.Mertes, S.Audonnet, **V. Jouan**, P.Olivier, G.Karcher, DU.Longrois and A.Bertrand. ^{201}Thallium and ^{99m}Tc-MIBI retention in an isolated heart model of low-flow ischemia and stunning: evidence of negligible impact of myocyte metabolism on tracer kinetics. Journal of nuclear Medicine, Vol 43, N°4 (April), 2002 : 566-574.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, P. Franck, P. Menu, N. De Talancé, F. Zannad, M-C. Laxenaire, D. Longrois, P-M. Mertes. Anaphylactic shock : a form of « distributive » shock without inhibition of cellular respiration. Anesthesiology, Vol 103, N° 1 (July), 2005 : 40-49.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, I. Lartaud, G. Bello, N. De Talancé, D. Longrois, P-M. Mertes. Comparison of Arginine Vasopressin, Terlipressin, or Epinephrine to correct hypotension in a model of anaphylactic shock in anesthetized Brown Norway rats. Anesthesiology, Vol 104, N°4 (April), 2006 : 734-741.

V. Jouan-Hureaux, S. Audonnet-Blaise, D. Lacatusu, MP. Krafft, P. Dewachter, G. Cauchois, JF. Stoltz, D. Longrois, P. Menu. Effects of a new perfluorocarbon solution on plasma and whole blood viscosity in the presence of albumin, hydroxyethylstarch or modified fluid gelatin. *An in vitro* rheological approach. Transfusion, Vol 46, N°11 (Nov), 2006 :1892-8.

P. Dewachter, I. Raëth-Fries, **V. Jouan-Hureaux**, P. Menu, C. Vigneron, D. Longrois, PM. Mertes. A comparison of epinephrine only, arginine vasopressin only, and epinephrine followed by arginine vasopressin on the survival rate in a rat model of anaphylactic shock. Anesthesiology, Vol 106 N°5 (May), 2007:977-83.

V. Hoffart, P. Maincent, A. Lamprecht, V. Latger-Cannard, V. Regnault, C. Merle, **V. Jouan-Hureaux**, T. Lecompte, C. Vigneron, N. Ubrich. Immunoadsorption of alloantibodies onto erythroid membrane antigens encapsulated into polymeric microparticles. Pharm Res. Vol 24, N°11 (Nov), 2007:2055-62. Epub 2007 Jun 14.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, J-L. Merlin, B. Faivre. Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab. Microvasc Res. 2011 Jul 22.

Communications par affiche:

- Internationale :

B. Faivre-Fiorina, T. Vigneron, **V. Jouan**, P. Labrude and C. Vigneron. A reducing power of red cells membrane towards plasma oxidized hemoglobin. XIIIe Meeting of the European Association for Red Cell Research, Barcelona, Spain. March 31-April 3, 2001. Abstract n°66 : 58.

V. Jouan, S. Audonnet, MP. Krafft, M. Gentil, P. Labrude, JF. Stolz, P. Menu. Do perfluorocarbon (PFC) emulsions modify red blood cell behavior in a hemodiluted rabbit ? IVe Intenational Symposium on Current Issues in Blood Substitute Research, Stockholm, Sweden. June 5-8, 2002 in Artificial Cells, Blood Substitute and Immobilization Biotechnology 2003, 31, (4), 511.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, I. Raëth-Fries, D. Longrois, PM. Mertes. Rapid Therapy with Epinephrine Is the Key Element of Survival after Anaphylactic Shock. Annual meeting of The American Society of Anesthesiologists (ASA), New Orleans, LA. October 17, 2006, in Anesthesiology 2006; 105: A1452

P. Dewachter, I. Raëth-Fries, **V. Jouan-Hureaux**, D. Longrois, PM. Mertes. Treatment of Anaphylactic Shock Occurring during Anesthesia: Which Therapeutical Goal? Annual meeting of The American Society of Anesthesiologists (ASA), New Orleans, LA. October 17, 2006, in Anesthesiology 2006; 105: A1453.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, JL. Merlin, B. Faivre. Investigation of the effect of cetuximab on endothelial cells and tumoral angiogenesis. IIIrd European Conference on Tumor Angiogenesis and Antiangiogenic Therapy (ECTA), Abano Terme, Padova, Italy. November 6-8, 2008. in Angiogenesis.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, I. Fries, JL. Merlin, B. Faivre. Effect of EGFR blockade on the molecular interactions between human tumoral and endothelial cells. 7TH International Symposium on the Biology of Endothelial Cells, Vienne, Austria. September 2-5, 2009.

J. Mriouah, **V. Jouan-Hureaux**, C. Boura, JL. Merlin, B. Faivre. Effect of cetuximab treatment on induction of angiogenesis by HNSCC cell line depending on PTEN expression. Advances in the cellular and molecular biology of angiogenesis, University of Birmingham, UK, June 27-29, 2011: P028.

- Nationale :

A. Banawer, **V. Jouan**, M. Marchand-Arvier, O. Agulles and C. Vigneron. Obtention de globules rouges modifiés améliorant leur conservation en immuno-hématologie. Congrès 2000 de la Société Française d'Hématologie, Paris. March 2000 in Hématologie 2000, 6 : 40.

A. Banawer, M. Marchand-Arvier, **V. Jouan**, O. Agulles and C. Vigneron. Proposition d'Hématies-tests stabilisées pour le dépistage des anticorps irréguliers anti-érythrocytaires. XXe Congrès de la Société française de Transfusion Sanguine, Paris La Villette. June 27-29, 2000 in Transfusion Clinique et Biologique 2000, 3 : 273.

C. Boura, **V. Jouan**, D. Longrois, PM. Mertes, P. Labrude and P.Menu. Mise au point d'un modèle d'étude in vivo du transport et de l'utilisation de l'oxygène tissulaire. 42e Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation, Paris. September 21-24, 2000 in Ann Fr Anesth Réanim 2000, 19 suppl 1, abstract R 198 : 137s.

A. Banawer, **V. Jouan**, M. Marchand-Arvier and C. Vigneron. RAI : vers un réactif stable. Congrès du Club du Globule Rouge : Anémie chronique et érythropoïèse, Bonifacio, Corsica. September 2001.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, P. Menu, P. Mairose, M.C. Laxenaire, A. Bellou, D. Longrois and P.M. Mertes. Metabolic and neuroendocrine profiles of anaphylactic shock in rats. XXIIe Congrès de l'académie Européenne d'allergologie et d'Immunologie Clinique, Paris. June 7-11, 2003.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, N. de Talancé, F. Zannad, D. Longrois and P.M. Mertes. Déficit en Arginine Vasopressine mis en évidence dans un modèle de choc anaphylactique chez le rat Brown Norway sensibilisé à l'ovalbumine. Congrès de médecine interne, Nancy. June 15-17, 2006.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, JL. Merlin, B. Faivre. Investigation of the effect of cetuximab on endothelial cells and tumoral angiogenesis. 1er Congrès National de la Société Française d'Angiogenèse, Versailles. November 28-29, 2008.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, I. Fries, JL. Merlin, B. Faivre. Direct or indirect angiogenic effects of cetuximab in human endothelial cell cultures. 1er Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie (ONCOTRANS) « Du Laboratoire au Patient et du Patient au Laboratoire », Nancy. March 19-20, 2009.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura, JL. Merlin, Béatrice Faivre. Molecular interactions between human tumoral and endothelial cells : effect of EGFR blockade. 3ième Forum du Cancéropôle du Grand-est (CGE), Strasbourg. November 19-20, 2009. RF(5)11.

J. Mriouah, **V. Jouan-Hureaux**, C. Boura, JL. Merlin, B. Faivre. Effect of cetuximab treatment on induction of angiogenesis by HNSCC cell line depending on PTEN expression. 2ième Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie ÉOncotrans, Nancy. September 8-9, 2011.

V. Jouan-Hureaux, C. Boura and B. Faivre. Paradoxal effect of Anti-EGFR therapies on tumoral angiogenesis. 3ième Congrès de la Société Française d'Angiogenèse, Bordeaux. October 9-11, 2011 in Targeted Oncology 2011.

V. Jouan-Hureaux, F. Massin, V. Latger-Cannard, C. Boura and B. Faivre. Characterization of microvesicles shed by Head and Neck Squamous Carcinoma Cells (HNSCC) and effect of cetuximab. 5ième Forum du Cancéropôle du Grand-est (CGE), Strasbourg. November 2-3, 2011.

- Avec discussion :

P. Dewachter, **V. Jouan**, P. Mairose, P. Menu, PC. Laxenaire, A. Bellou, D. Longrois and PM. Mertes. Profil métabolique et neuroendocrinien du choc anaphylactique chez le rat Brown Norway. 44e Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation, Paris. September 19-22, 2002. R339.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, P. Menu, P. Mairose, M.C. Laxenaire, A. Bellou, D. Longrois and P.M. Mertes. Metabolic and neuroendocrine profiles of anaphylactic shock in rats. Congrès de la Société Européenne des Anesthésiologistes, Glasgow. Mai 31 Ŕ June 3, 2003 In European Journal of Anaesthesiology 2003, 20, abstract A237 : 63.

P. Dewachter, P. Franck, **V. Jouan-Hureaux**, P. Menu, N. De Talancé, M. Laxenaire, D. Longrois and PM. Mertes. Profil métabolique du choc anaphylactique chez le rat Brown Norway. 45e Congrès National d'Anesthésie et de Réanimation, Paris. September 18-21, in Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation 2003, 22, (suppl 2), abstract R215 : 213s.

P. Dewachter, **V. Jouan-Hureaux**, P. Franck, P. Menu, C. Vigneron, D. Longrois, P-M. Mertes. Hemodynamic and metabolic profiles of anaphylactic shock in anesthetized Brown Norway rats. Meeting of the European Society of Anaesthesiologists and European Academy of Anaesthesiology, Lisbon, Portugal. June 5-8, 2004 in European Journal of anaesthesiology 2004, 21, (suppl 32), abstract A213.

Valérie Jouan-Hureaux, Frédéric Massin, Véronique Latger-Cannard, Cédric Boura, Béatrice Faivre. Modulation of tumor microvesicles shedding by cetuximab : case of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). 2ième Colloque Inter-Régional Grand-Est de Recherche Translationnelle en Oncologie Ŕ Oncotrans, Nancy. September 8-9, 2011.

Propriété intellectuelle :

V. Jouan-Hureaux, M.Marchand-Arvier, C. Vigneron. Enveloppe Soleau déposé à l'INPI de Nancy le 8 Octobre 2004.

Sommaire

Remerciements ..... **i**
Liste des abréviations ..... **iv**
Liste des illustrations ..... **xii**
Liste des publications ..... **xx**
Partie bibliographique ..... **iii**
PARTIE 1 : L'endothélium vasculaire : rappel **1**
I. Les cellules endothéliales 3
I.1. Le glycocalyx 4
I.2. Le cytosquelette 5
I.3. La membrane plasmique 6
II. Les jonctions endothéliales 13
III. Les interactions des cellules endothéliales avec la membrane basale : 15
IV. Les interactions des cellules endothéliales avec les péricytes : 17
V. Les principales fonctions de l'endothélium : 18
PARTIE 2 : L'angiogenèse : au départ, un phénomène physiologique **21**
I. Les différents mécanismes de formation des vaisseaux sanguins : 23
I.1. La vasculogenèse : 23
I.2. La tubulogenèse : 23
I.3. L'angiogenèse : 24
I.4. L'artériogenèse : 26
II. Le switch angiogénique : 26
II.1. Les facteurs pro-angiogéniques : 27
II.2. Les facteurs anti-angiogéniques : 27
III. Les différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement capillaire 30
III.1. Mécanisme d'induction et de déstabilisation de la paroi des capillaires 32
III.2. Mise en place du bourgeonnement endothélial 38
III.3. Stabilisation et maturation du néovaisseau : 47
III.4. Structure des nouveaux capillaires 52
PARTIE 3 : L'angiogenèse tumorale **53**
I. Introduction 55
I.1. Le développement des tumeurs 55
I.2. Cas des cancers des VADS 58
I.3. Le récepteur EGFR : 60
I.4. Le facteur tissulaire (FT) : 64
II. L'angiogenèse tumorale 68
II.1. Les vaisseaux tumoraux : 68
II.2. Les mécanismes de formation : 72
II.3. Les étapes de l'angiogenèse tumorale : 73
II.4. Les thérapies ciblées 80
II.5. Les thérapies anti-angiogéniques 84
II.6. Récapitulatif des différentes thérapies 88
PARTIE 4 : Les microvésicules tumorales **89**
I. Les microvésicules : 91
I.1. Définition 91
I.2. Composition : 92
I.3. Mécanisme de formation : 94
II. Rôle des TMV dans le cancer : 97
II.1. Le transfert d'information : 99
II.2. La survie : 100

II.3. L'invasion et les métastases : 101
II.4. La modification du microenvironnement : 102
II.5. La coagulation : 102
II.6. L'angiogenèse : 104
PARTIE EXPERIMENTALE 107
Partie 1 : Matériel et méthodes 109
I. Matériel 111
I.1. Les cellules endothéliales : 111
I.2. Les lignées cellulaires tumorales : 114
I.3. Les molécules thérapeutiques utilisées 116
II. Méthodes 117
II.1. La numération cellulaire : 117
II.2. Les milieux conditionnés : 118
II.3. Etude de la viabilité des cellules : 123
II.4. Etude de la formation des structures pseudo-capillaires *in vitro* : 129
II.5. Expression des protéines par western blot : 132
II.6. Les microparticules : 136
II.7. La cytométrie en flux 142
II.8. Etude de la fusion des TMV avec les CE par cytométrie et imagerie en flux: 152
II.9. Mesure de l'activité pro-coagulante des TMV par thrombinographie 154
II.10. Mesure de l'agrégation plaquettaire : 157
II.11. Analyses statistiques 159
Partie 2 : Résultats 161
Chapitre 1 : Evaluation *in vitro* de nouvelles molécules anti-angiogénique ciblant VEGFR-2 165
I. Effet sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC : 166
II. Effet sur la formation de tubes pseudo-capillaires : 168
III. Effet sur l'agrégation plaquettaire : 170
IV. Discussion : 173
Chapitre 2 : Evaluation *in vitro* des anticorps ciblant EGFR 177
I. Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des lignées cellulaires de cancer des VADS 179
I.1. Effet de la concentration en cetuximab 179
I.2. Influence de l'EGF sur la réponse des cellules tumorales au cetuximab : 180
II. Effet direct du cetuximab sur la viabilité et l'activité métabolique des cellules endothéliales 182
III. Effet du cetuximab sur la composition des milieux conditionnés : 183
III.1. Dosage des protéines totales : 183
III.2. Dosage du VEGF : 184
III.3. Evaluation des différents facteurs impliqués dans l'angiogenèse : 185
IV. Effet des milieux conditionnés sur les cellules endothéliales : 188
IV.1. Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC : 188
IV.2. Effet du cetuximab sur la formation des tubes pseudo-capillaires *in vitro* : 190
IV.3. Effet du cetuximab sur l'expression de récepteurs endothéliaux impliqués dans l'angiogenèse : 191
V. Evaluation de l'effet du panitumumab : 194

V.1. Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules tumorales : 195
V.2. Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales : 196
V.3. Effet du panitumumab sur la composition des milieux conditionnés : 196
VI. Discussion : 200
Chapitre 3 : Evaluation des microvésicules libérées par les cellules tumorales exposées au cetuximab 207
I. Mise en évidence des TMV 210
II. Effet du cetuximab sur le relargage des TMV: 214
III. Effet du cetuximab sur l'expression de protéines membranaires à la surface des lignées et des TMV : 215
III.1. Annexine-V : 215
III.2. EGFR : 217
III.3. EPCAM : 218
III.4. TF : 219
IV. Risque thrombotique des TMV 221
IV.1. Apport global : 222
IV.2. Apport en PL : 223
IV.3. Apport en TF : 225
V. Interaction des TMV avec les EC : 226
V.1. Marquage des TMV par le DiO : 227
V.2. Analyse des interactions par cytométrie en flux 228
V.3. Analyse des interactions par imagerie en flux 230
VI. Discussion : 234
Chapitre 4 : Conclusion et perspectives 237
Annexes 241
Références bibliographiques 251

Partie bibliographique

Le système vasculaire est un réseau essentiel permettant au sang de circuler dans tout l'organisme et nécessite la formation d'un réseau cohérent et continu pour que le système soit pleinement fonctionnel. La dérégulation de son développement conduit à de nombreuses pathologies :

- lorsqu'il est trop peu développé, il induit une dégénération tissulaire et complique la réparation des tissus lors de blessures, provoque une ischémie au niveau du myocarde et peut aboutir à un arrêt cardiaque et également à une perte de vision due à la dégénérescence de la macula chez les personnes âgées.
- à l'inverse, lorsqu'il est trop fortement stimulé, il peut conduire à une perte de la vision dans le cas des rétinopathies diabétiques, à des maladies inflammatoires (polyarthrite rhumatoïde) ou au développement de cancers et à la dissémination des métastases.

Les progrès accomplis dans la compréhension des mécanismes de formation de ce réseau vasculaire tels que l'angiogenèse a permis le développement de nouvelles thérapies anti-cancéreuses comme les thérapies ciblées anti-angiogéniques. Cependant, de nombreux progrès sont encore nécessaires dans la compréhension du système pour minimiser les effets secondaires et éviter la résistance à ces nouveaux traitements.

La formation des vaisseaux sanguins nécessite une réorganisation des cellules qui les constituent. Un rappel concernant la structure de la paroi des vaisseaux ou endothélium vasculaire est nécessaire pour une bonne compréhension et est détaillé dans la première partie de ce document. Puis, dans une deuxième partie, nous aborderons les différents mécanismes de formation de ces vaisseaux sanguins, notamment celui de l'angiogenèse. La troisième partie de cette revue bibliographique est consacrée au mécanisme de l'angiogenèse déclanchée lors du développement d'un cancer encore appelé angiogenèse tumorale ; les nouveaux traitements anti-cancéreux dits ciblés y seront également évoqués. Enfin, un mode de communication cellulaire encore mal connu, les microvésicules, et intervenant dans le développement des cancers et dans l'angiogenèse sera abordé dans la dernière partie de ce document.

PARTIE 1 :

L'endothélium vasculaire : rappel

L'endothélium vasculaire est formé par une couche unique de cellules endothéliales (CE) tapissant la face interne des vaisseaux sanguins. Ces cellules endothéliales sont fermement reliées les unes aux autres par des jonctions intercellulaires. Leurs contacts étroits avec les cellules musculaires lisses ou péricytes et la membrane basale permettent d'assurer une certaine intégrité vasculaire et permettent de réguler la perméabilité des vaisseaux.

I. Les cellules endothéliales

Les CE sont aplaties et allongées avec un noyau saillant du côté de la lumière vasculaire (Figure 1). Elles contiennent tout l'équipement en organites d'une cellule eucaryote (mitochondries, lysosomes, réticulum endoplasmique, granules de sécrétion, etc.) et des structures en forme de bâtonnets spécifiques des CE appelés corps de Weibel-Palade qui contiennent notamment le facteur de von Willebrand (vWF) et l'angiopoïétine-2 (Ang-2).
Ces cellules endothéliales sont polarisées : la face apicale (ou luminale) est en contact direct avec le flux sanguin alors que la face basale (ou abluminale) est en contact avec la paroi vasculaire.

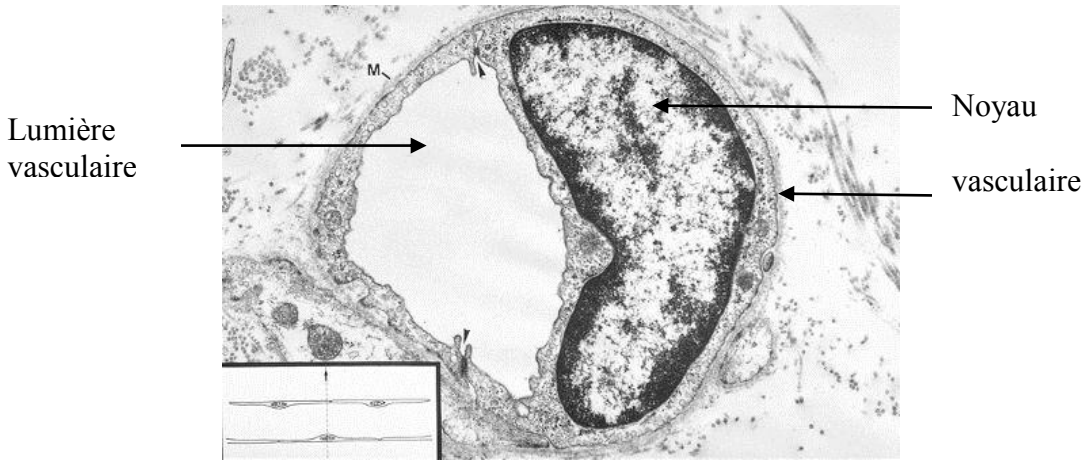


Figure 1 : Coupe transversale d'un capillaire observé par microcopie électronique *(extrait du cours d'histologie, UC Louvain, faculté de Médecine, avec l'autorisation des auteurs).*

Dans l'endothélium mature, les cellules endothéliales sont « endormies », état plus communément appelé état de quiescence. Leur turn-over est supérieur à 1000 jours avec un renouvellement vasculaire tous les 3/4 ans. Elles sont génétiquement stables et ne répondent

pas aux signaux contenus dans le sérum. Ainsi, elles ne prolifèrent plus, sont résistantes à l'apoptose et contrôlent la perméabilité paracellulaire.

I.1. Le glycocalyx

La face luminale des cellules endothéliales est recouverte d'un manteau appelé glycocalyx dont l'épaisseur varie selon le type de vaisseaux. Il est constitué de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes et de polymère d'acide hyaluronique formant un réseau attaché à l'endothélium par l'intermédiaire de glycoprotéines traversant la membrane comme les molécules d'adhésion PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) (Cf. figure 2). Des glycosaminoglycanes solubles et des composés solubles du plasma sont enrobés dans cette matrice. La charge nette de ce réseau est négative et permet la répulsion ou l'attraction des composés du plasma par interaction électrostatique.

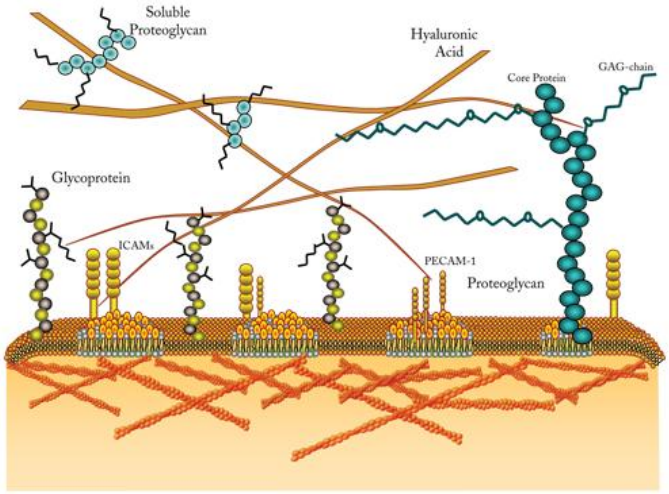


Figure 2 : Représentation de la surface luminale de l'endothélium vasculaire. *(Extrait de Yuan, Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease : regulation of endothelial barrier function, 2010) (1).*

Le glycocalyx joue donc un rôle de filtre qui permet de limiter le passage de molécules et de cellules à travers la paroi des vaisseaux (1). Sous des conditions normales (physiologiques), le transfert de molécules solubles et de fluides à travers la paroi des vaisseaux est contrôlé par les facteurs hémodynamiques (flux sanguin, pression tissulaire) et par cette barrière endothéliale.

I.2. Le cytosquelette

L'intérieur de la cellule n'est pas qu'une simple solution aqueuse, elle contient également différents types de fibres dont l'ensemble forme le cytosquelette (Cf. figure 3). Cette structure est importante pour la morphologie, l'adhésion et la migration des cellules. Elle joue également un rôle dans la fonction de barrière de l'endothélium.

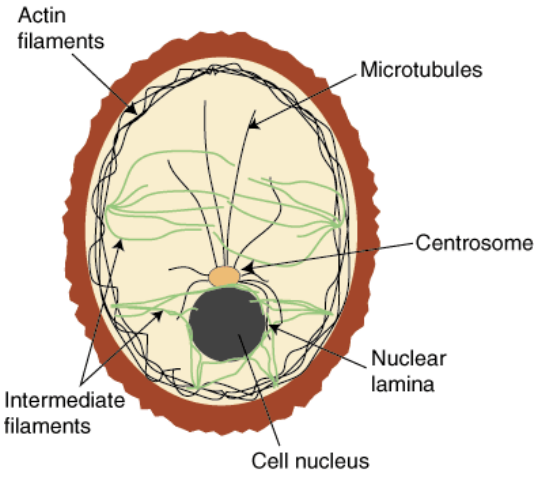


Figure 3 : Représentation schématique des fibres constituant le cytosquelette : microtubules, filaments intermédiaires et filaments d'actine. *(Extrait du site internet http://envorganelles.wikispaces.com/CYTOSKELETON+8+KM)*

Le cytosquelette est stabilisé par des interactions avec différentes protéines cytosoliques (comme les caténines α β γ ou p120, …) qui le relie à la membrane plasmique (Cf. figure 4). Le cytosquelette est également relié à la membrane basale (ou matrice extracellulaire) par des interactions avec les intégrines α et β.

En réponse à de nombreux stimuli, les microtubules se dépolymérisent. Les sous-unités α- et β- de la tubuline s'associent alors avec les filaments d'actine et se réorganisent en faisceaux linéaires de fibres de stress. La formation de ces fibres de stress crée des tensions liées à la contraction et provoque l'ouverture transitoire de pores endothéliaux ou de trous entre les cellules adjacentes (voie para-cellulaire) et augmente la perméabilité vasculaire.

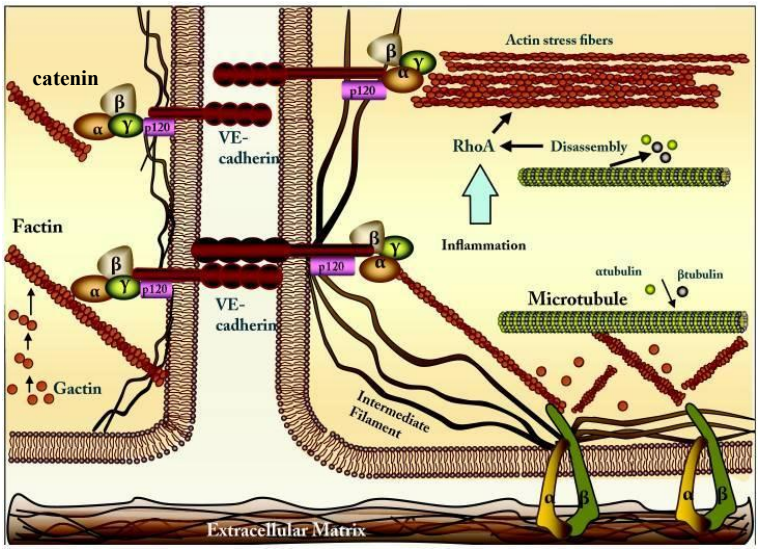


Figure 4 : Interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. *(Extrait de Yuan, Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease : regulation of endothelial barrier function, 2010) (2).*

I.3. La membrane plasmique

La membrane des cellules endothéliales est constituée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées différentes protéines transmembranaires jouant un rôle dans les différentes fonctions cellulaires. On trouve par exemple :

- des protéines jonctionnelles comme les cadhérines ou les occludines permettant la mise en place des jonctions adhérentes et serrées entre les cellules et l'établissement de la barrière endothéliale,

- des canaux comme les connexines ou les canaux potassiques permettant la communication entre les cellules,

- des molécules d'adhérences comme les sélectines et les ICAM (inter-cellular adhesion molecule) permettant le passage des cellules du système immunitaire lors des phénomènes d'inflammation ou d'infection et permettant la réparation tissulaire,

- des intégrines permettant l'adhésion à la matrice et favorisant la migration des CE lors de la formation de nouveaux vaisseaux,

- différents récepteurs à activité tyrosine kinase dont Tie-2 (tunica interna endothelial cell kinase) qui est responsable de l'état de quiescence des CE, VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) et Notch qui sont impliqués dans le développement et la maintenance des vaisseaux, Ephrine qui joue un rôle dans l'établissement de la différentiation

artério-veineuse, ou encore PDGFR (platelet derived growth factor receptor) qui est impliqué dans le recrutement des péricytes,

- des protéines G responsable de la transmission des signaux intracellulaires,
- etc…

Seules, certaines protéines membranaires intervenant dans la formation des vaisseaux et étudiées plus particulièrement au cours de ces travaux de thèse sont détaillées ci-dessous.

I.3.a. Le récepteur VEGFR-2 :

Le récepteur VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) est exprimé principalement dans les vaisseaux en croissance (3). Son ligand, le VEGF (vascular endothelial growth factor) est un puisant régulateur de l'angiogenèse identifié en premier lieu pour son activité sur la perméabilité vasculaire. C'est une molécule à action paracrine c'est-à-dire qu'elle agit à distance du lieu où elle a été produite et sa présence doit être finement régulée dans l'espace, le temps et en nombre pour éviter les désordres vasculaires (4).

La famille du VEGF comprend 7 membres dont le VEGF-A. Il existe sous différentes isoformes (ou variants) après épissage alternatif du gène aboutissant à des protéines ayant un nombre d'acides aminés différents (entre 121 et 206 AA) et possédant des affinités différentes pour l'héparine en fonction de la composition de leurs motifs basiques (Cf. figure 5). Ces variants sont donc plus ou moins capables d'interagir avec les héparanes sulfates (HS) ou les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) de la matrice extracellulaire (MEC) et ils sont ainsi plus ou moins séquestrés dans la matrice. Le VEGF-A165 est la forme pro-angiogénique majoritaire chez l'homme. Il est diffusible et en parti séquestré, mais peut être libéré par l'action d'enzymes comme les héparinases ou les métalloprotéases.

Depuis quelques temps, Bates et al ont montrés l'existence d'autres isoformes du VEGF-A possédant des activités anti-angiogéniques (5). Celles-ci ont été nommées VEGF-A_{XXX}b contrairement aux autres formes à activité pro-angiogénique nommées VEGF-A_{XXX}a ou encore VEGF-Axxx (Cf. figure 5). Ils lient le récepteur mais n'induisent pas son activation. C'est la proportion existant entre ces deux familles qui détermine le potentiel angiogénique du VEGF.

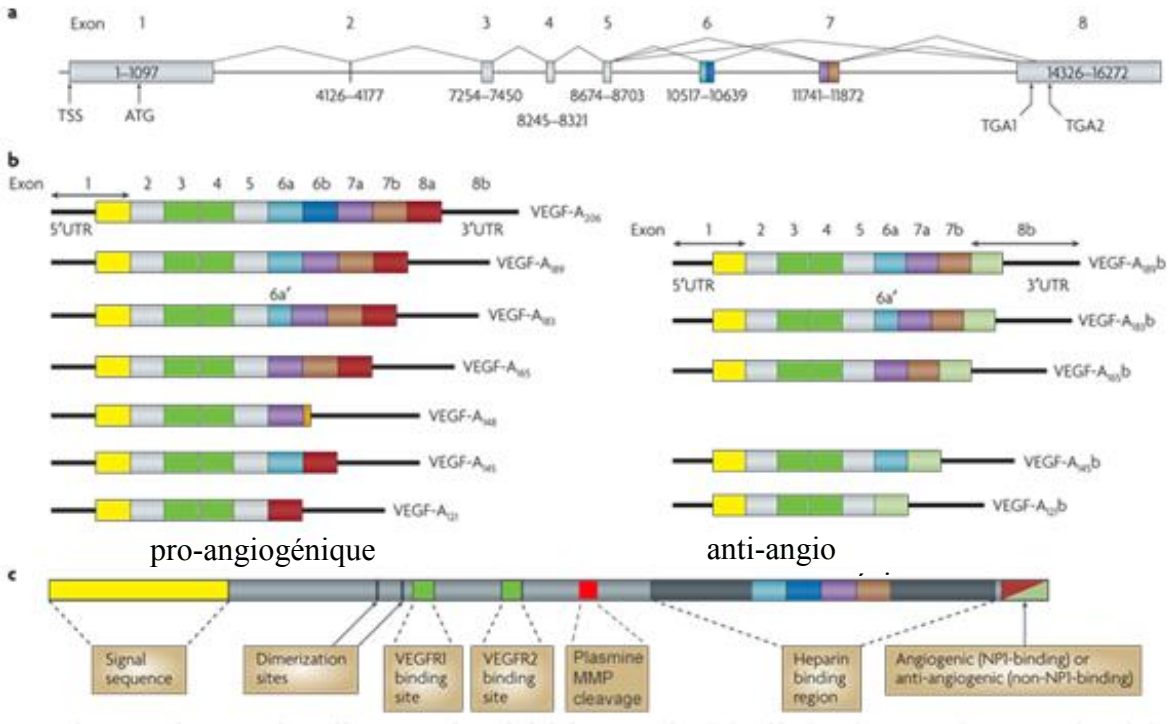


Figure 5 : Les différents isoformes du VEGF-A. *(Adapté de Harper, Nature Review Cancer, 2008) (5).*

Comme pour tous les récepteurs à activité tyrosine kinase, la liaison du VEGF (sous forme dimérique) sur le domaine extracellulaire de VEGFR-2 induit la dimérisation du récepteur (sous forme d'homo- ou d'hétéro-dimère). Ceci induit un changement conformationnel dans le domaine intracellulaire conduisant à son activation par exposition du site de liaison à l'ATP (adénosine triphosphate) au domaine kinase. La liaison de l'ATP est suivie d'une auto- ou trans-phosphorylation des résidus tyrosines (par transfert d'un groupement phosphate) du récepteur mais également de molécules effectrices transductrices du signal possédant un domaine SH2 (Src homology 2-domain-containing proteins).

L'activation du récepteur conduit à une cascade de phosphorylation activant des molécules effectrices en aval du signal et conduisant à l'induction de différentes fonctions comme la perméabilité vasculaire, la prolifération, la migration cellulaire et la survie ; fonctions impliquées lors du processus d'angiogenèse (Cf. figure 6).

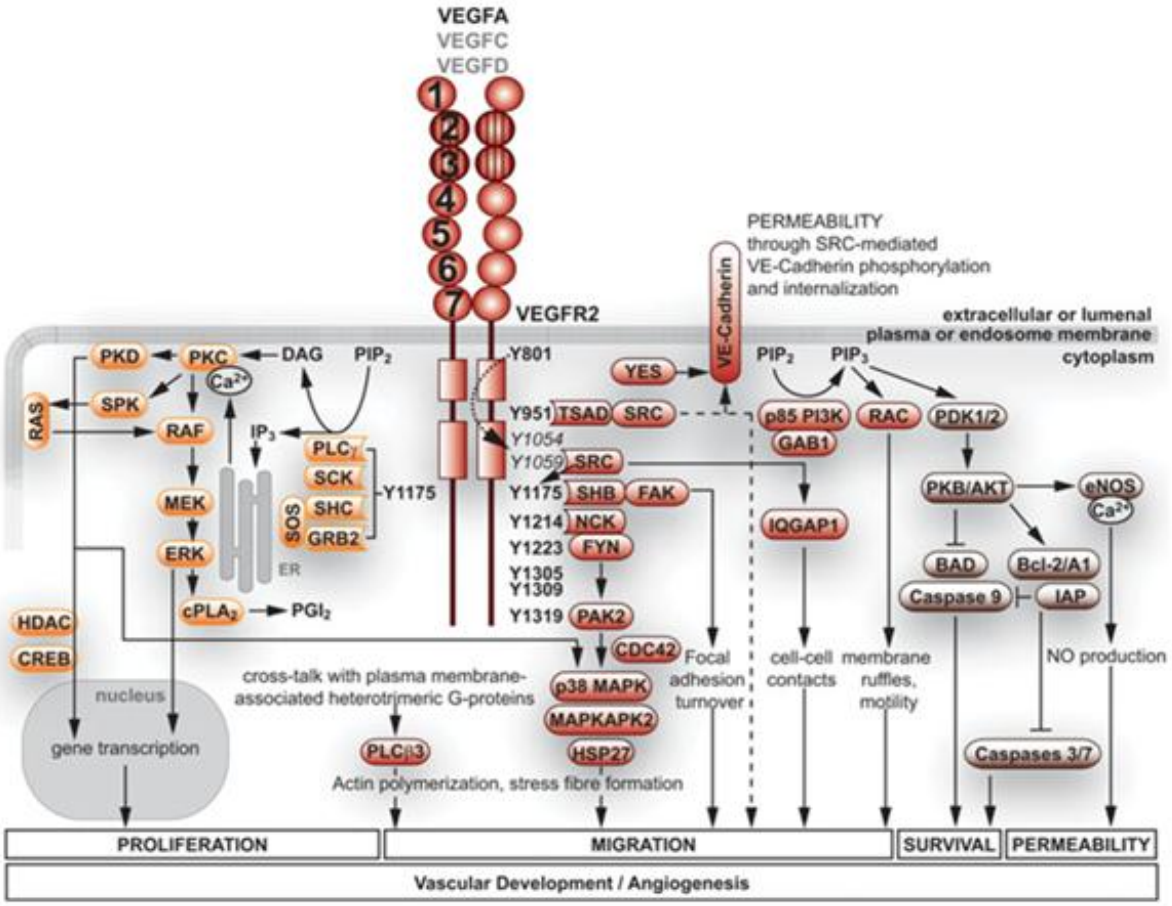


Figure 6 : Les différentes voies de signalisation de VEGFR-2 *(Extrait de KOCH, Biochem J, 2011)(3).*

I.3.b. **Le récepteur Notch :**

Le récepteur Notch (Notch-1 à Notch-4) et ses ligands Dll (Delta-like ligand : dll-1, dll-3, dll-4) et JAG (Jagged-1 et -2) sont des protéines transmembranaires exprimées à la surface des cellules ce qui limite le signal aux cellules voisines (leur structure est indiquée dans la figure 7).

Après liaison avec son ligand, le récepteur Notch subit plusieurs attaques enzymatiques (Cf. figure 7) :

- la première dégradation protéolytique a lieu dans la partie extracellulaire du récepteur et est médiée par une métalloprotéase appartenant à la famille TACE (tumor necrosis factor-alpha converting enzyme). Cette coupure libère la partie extracellulaire du récepteur ou NECD (Notch extracellular domain) et crée un fragment extracellulaire attaché à la membrane de la cellule ligand ou NEXT (Notch extracellular truncation).

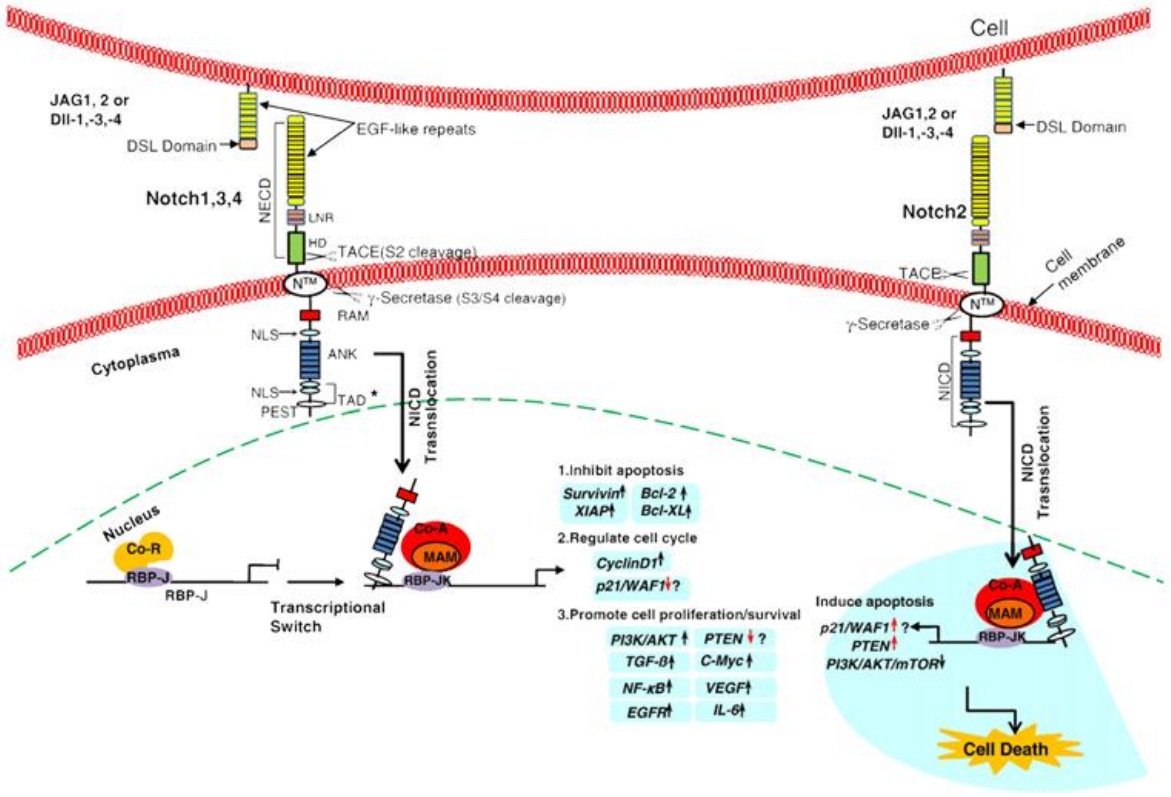


Figure 7 : Structure et voie de signalisation de Notch. *(Extrait de Guo, BBA, 2011)(6).*
Ligand de notch = serrate, delta delta-like (dll) et jagged (JAG). DSL= domaine Delta/Serrate/LAG-2, RAM= molécule associée à la protéine RBP-Jk, ANK= répétition d'ankyrine, TAD= domaine de transactivation, PEST= domaine riche en proline, glutamine, sérine et thréonine, NLS= signal de localisation nucléaire. Co-A= Co-activateur de la transcription, Co-R= Co-répresseur de la transcription.

Le fragment NEXT est alors trans-endocyté c'est-à-dire endocyté par la cellule exprimant le ligand (Cf. figure 8). Cette élimination du ligand a lieu avant le déclenchement de l'activité de Notch et permet de faciliter le recyclage et de générer un ligand plus actif. Cette voie d'endocytose a été proposée pour générer les forces suffisantes pour la protéolyse activatrice de Notch.

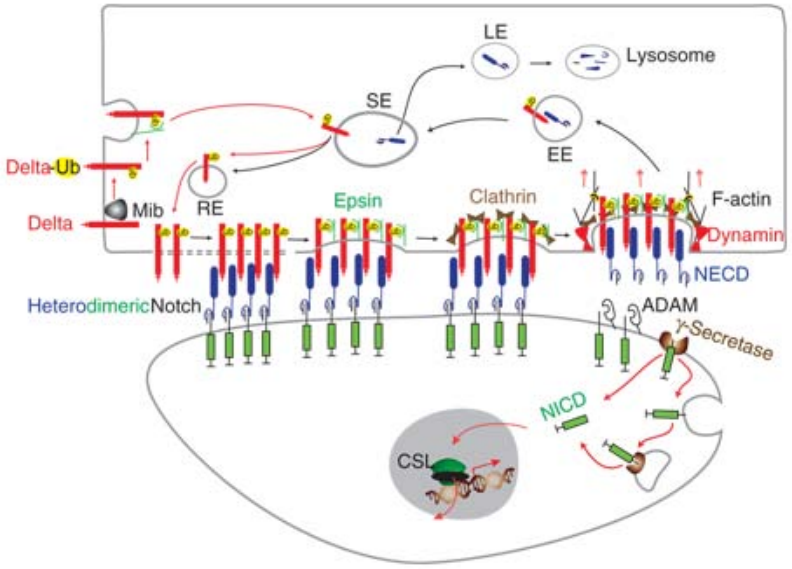


Figure 8: Voie de recyclage du ligand de Notch. *(Extrait de D'Souza, Current topic dev Biol, 2010)(7)*. Le ligand de notch est ubiquitinylé par la protéine Mib ce qui permet son interaction avec l'epsine et conduit à son internalisation.

- la deuxième dégradation protéolytique est localisée dans le domaine transmembranaire de Notch et est médiée par un complexe multiprotéique contenant la γ-secrétase. Cette coupure conduit à la libération du domaine intracellulaire de Notch ou NICD (Notch intracellular domain) qui est ensuite transloqué dans le noyau où il pourra se lier au facteur de transcription RBPJ (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region). En absence de NICD, la protéine RBPJ recrute des co-répresseurs (Co-R) et inhibe la transcription des gènes cibles de Notch. Mais, lorsque NICD est présent, le complexe formé avec la protéine RBPJ et la protéine Mastermind recrute des co-activateurs (Co-A) de la transcription (comme l'histone acétyl transférase (HAT) ou p300) et peut alors induire l'expression des gènes cibles de Notch (Cf. figure 7) (8-9).

Cette voie de signalisation joue un rôle important dans la différenciation, la survie et la prolifération cellulaire et est impliqué dans la vasculogenèse et l'angiogenèse.

I.3.c. **PECAM-1 :**

PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 ou CD-31) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des immunoglobulines et est exprimée constitutivement à la surface des cellules endothéliales. Localisée au niveau des jonctions intercellulaire, elle est impliquée dans la perméabilité vasculaire et la transmigration des

cellules immunitaires et inflammatoires à travers la paroi vasculaire. Au niveau basal, elle joue un rôle dans les processus d'adhésion et de migration des CE grâce à son association avec les protéines du cytosquelette (actine) et à la modulation de l'activité des intégrines (10).

Le domaine extracellulaire de PECAM-1 est formé de 6 motifs de type immunoglobuline et interagit de manière homophile ou hétérophile avec son ligand localisé sur la cellule adjacente comme par exemple l'intégrine αvβ3 (Cf. figure 9). Le domaine cytoplasmique de PECAM-1 contient des résidus tyrosine ou sérine localisés dans la partie ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs). Ces résidus peuvent être phosphorylés en réponse à de nombreux stimuli comme le cross-linking de PECAM-1 ou encore l'adhésion avec la fibronectine ou le collagène (11).

PECAM-1 n'a pas d'activité enzymatique intrinsèque mais est capable de recruter des kinases (Src) permettant de phosphoryler les résidus tyrosine et crée un site d'ancrage pour la liaison de protéines cytosoliques possédant un domaine SH2 comme les phosphatases SHP responsables de la fonction inhibitrice de PECAM-1 dans la signalisation des récepteurs immunitaires et plaquettaires (11) (Cf. figure 9).
Le domaine intracellulaire est capable d'interagir avec d'autres protéines cytosoliques comme la β-caténine (12). PECAM joue ainsi un rôle dans la formation des jonctions adhérentes (11) mais également dans la prolifération des CE puisque la β-caténine est capable de se transloquer dans le noyau et d'induire l'expression de gènes impliqués dans cette activité (cycline D1 par exemple) (13).

Il a été montré que PECAM-1 était également impliquée dans :

- la formation des tubes pseudocapillaires *in vitro* (14-15),
- la migration des CE (16) à travers la déphosphorylation des protéines des plaques d'adhésion focale comme la paxilline et la vinculine médiée par SHP-2,
- et l'angiogenèse *in vivo* (17) par son implication dans la formation des filopodes (18).

Ces auteurs ont montré que les souris déficientes en PECAM-1 présentent des vaisseaux plus courts, plus réguliers et moins fuyant ; ils suggèrent un rôle des agonistes de PECAM-1 dans la normalisation des vaisseaux sanguins.

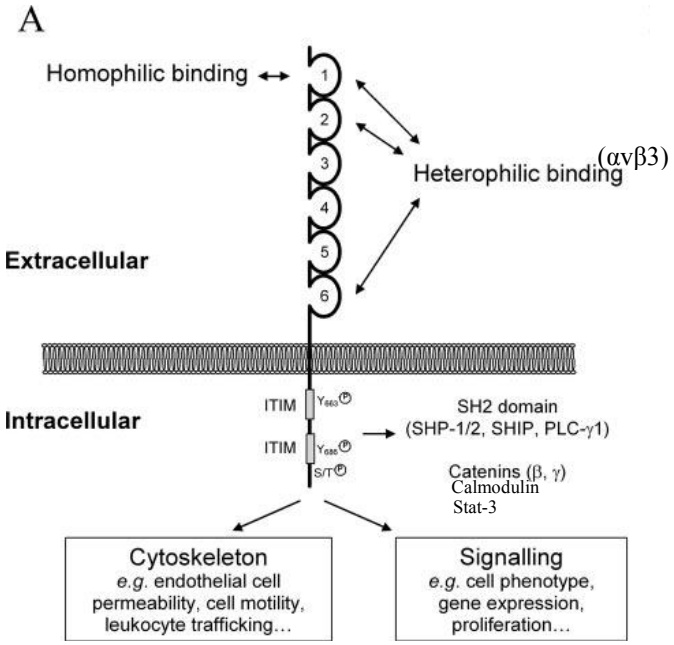


Figure 9 : Structure et voie de signalisation de PECAM-1. *(Adapté de Woodfin, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007) (19).*

L'épissage alternatif du gène de PECAM-1 conduit à 8 isoformes différentes dans la longueur du domaine intracellulaire et dont l'expression est régulée différemment lors du développement et de l'angiogenèse (20-22). Ceci a un impact sur l'adhésion, la migration des cellules et la formation des capillaires par modulation de la voie de signalisation MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinases /extracellular signal-regulated kinase) (21).

De plus, l'expression de PECAM-1 est stimulée par le VEGF (23). Des études ont également montré le rôle de PECAM-1 et de TSP-1 (thrombospondine-1) comme régulateur critique d'un switch favorisant la régulation de l'angiogenèse ou l'état différencié respectivement (24-26).

Enfin, l'équipe de Gu a montré que PECAM était localisée avec Tie-2 et la VE-cadhérine (cadhérine endothéliale vasculaire) et permettait l'inhibition de ces voies de signalisation lors du développement vasculaire (11),VE-cadhérine étant impliquée dans la régulation négative de VEGFR-2.

II. Les jonctions endothéliales

Les cellules endothéliales présentent plusieurs types de jonctions formées par interaction de complexes multiprotéiques intracellulaires et transmembranaires appartenant à la famille des molécules d'adhésion cellulaires (ou CAM) (Cf. figure 10) :

- les jonctions serrées (ou tight) prédominent au niveau de l'endothélium et assurent une barrière endothéliale relativement imperméable.

- les jonctions communicantes (ou gap) sont présentes en grand nombre dans toutes les cellules qui constituent les vaisseaux sanguins et sont associées aux jonctions serrées. Ce type de jonction permet de faire passer des petites molécules (ions, métabolites) d'une cellule à l'autre et facilite la transmission du signal entre les cellules.

- les jonctions adhérentes (ou adherens) sont présentes également dans tout le système vasculaire. Elles sont formées par interaction de complexes multimériques de cadhérines laissant un petit espace intercellulaire contrairement aux jonctions serrées où les membranes plasmiques fusionnent.

Le domaine cytoplasmique de ces protéines jonctionnelles est relié aux protéines du cytosquelette par l'intermédiaire de protéines cytoplasmiques (γ- et β-caténines et p120) (27-29). Elles sont capables d'interagir avec les composants majeurs des deux autres types de jonctions et sont au carrefour de voies de signalisation qui régulent l'adhérence cellulaire et la morphologie vasculaire (30).

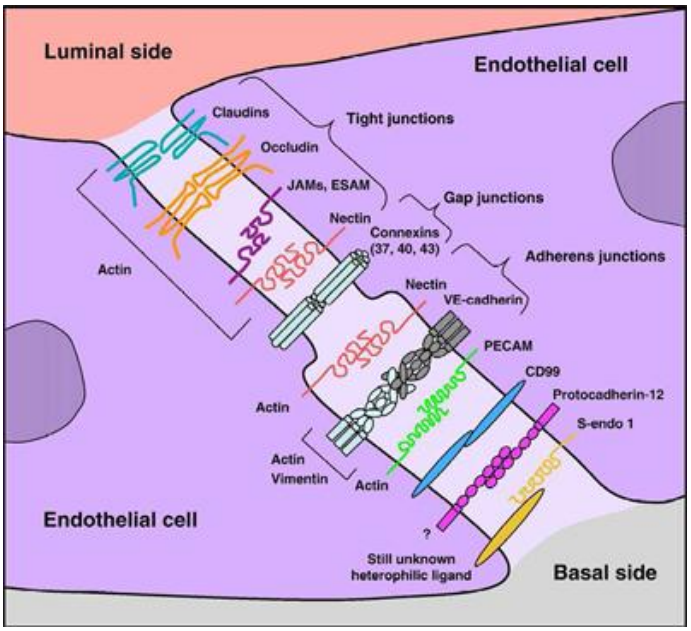


Figure 10 : Représentation des différents types de jonctions. *(Extrait de la thèse de T. Mannic soutenue publiquement le 29 octobre 2009, l'Université Joseph Fourier Grenoble 1)*

III. Les interactions des cellules endothéliales avec la membrane basale :

La face basale des CE est en contact avec la membrane basale (MB), laquelle est constituée d'une couche de matrice extracellulaire (MEC) spécialisée synthétisée par les CE. Cette membrane permet de séparer les CE du tissu conjonctif sous-jacent, offrant ainsi un support aux cellules et donc aux tissus qui la composent. Outre son rôle de soutien et de résistance mécanique exercée par l'environnement, elle a un rôle dans la diffusion de l'information permettant de réguler le comportement des cellules (croissance, survie). Elle est notamment nécessaire à l'initiation et au développement des nouveaux vaisseaux.

La composition moléculaire de ce réseau est très hétérogène. Elle est composée de polysaccharides et de protéines fibreuses dont le collagène de type IV, la laminine, l'entactine et le perlecan (Cf. figure 11). De nombreux autres composés sont également présents mais en moindre proportion (fibronectine, collagène de type XV et XVIII, fibrine….).

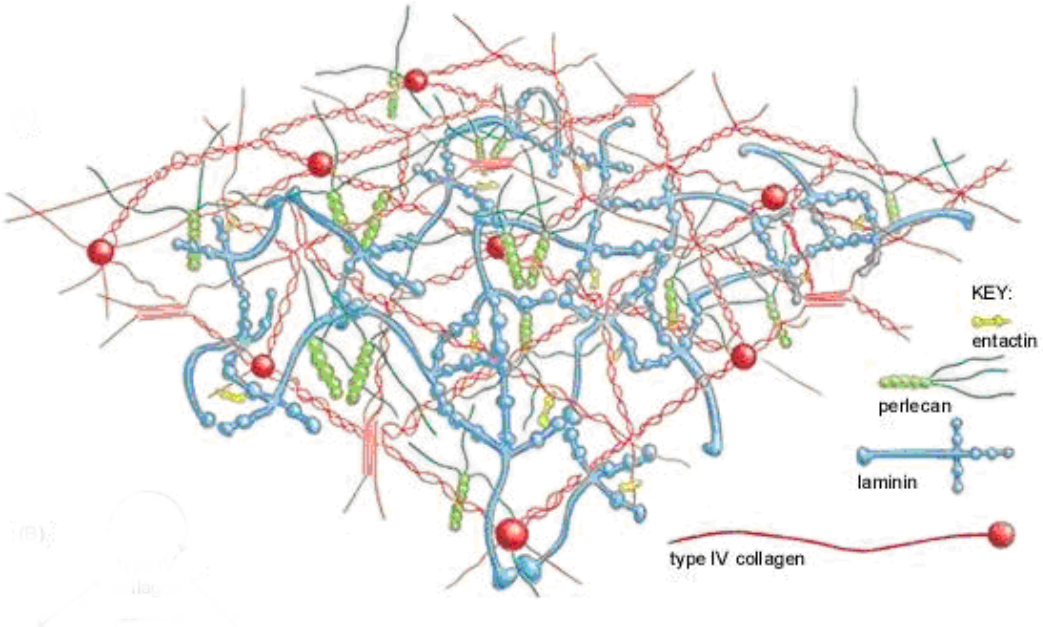


Figure 11 : Représentation de la structure moléculaire de la membrane basale. *(Extrait de Alberts, The Extracellular Matrix of Animals, Molecular Biology of the Cell, 1994)(31).*

La membrane basale est également un réservoir de facteurs à activité pro-angiogénique (comme les facteurs de croissance FGF-2 (fibroblast growth factor-2) et VEGF sequestrés par

leur domaine de liaison à l'héparine et aux héparanes sulfates). Elle est également un réservoir de facteurs à activité anti-angiogénique comme les produits de dégradation du collagène IV comme l'arrestène (α1[IV]NC1) (32), la canstatine (α2[IV]NC1) (33) et la tumstatine (α3[IV]NC1) (34) ou du collagène XVIII comme l'endostatine (35). Le perlecan sert de bouclier contre les attaques protéolytiques et limite ainsi la dégradation de la membrane basale et la libération des facteurs qui y sont liés. Cependant, ces facteurs sont tout de même susceptibles d'être libérés par l'action des métalloprotéases.

Les CE sont ancrées à la membrane basale par les plaques d'adhésion focales, lesquelles sont connectées aux jonctions intercellulaires par le biais du cytosquelette. Les plaques d'adhésion focales sont des microdomaines de rafts lipidiques localisés au niveau basal et comportant des récepteurs transmembranaires hétérodimériques : les intégrines (Cf. figure 12).
Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques constituées des sous-unités α et β. Il existe 18 sous-unités α et 8 sous unités β, leur association peut alors donner lieu à 24 intégrines différentes notamment au niveau de leur affinité vis-à-vis des différents composés de la matrice (Cf. figure 13).

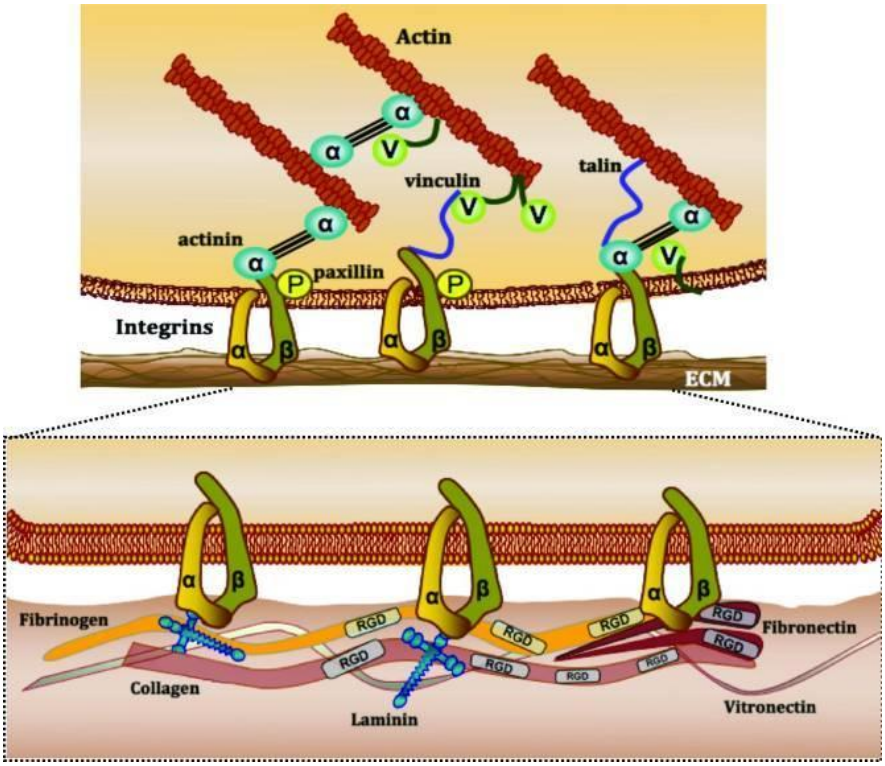
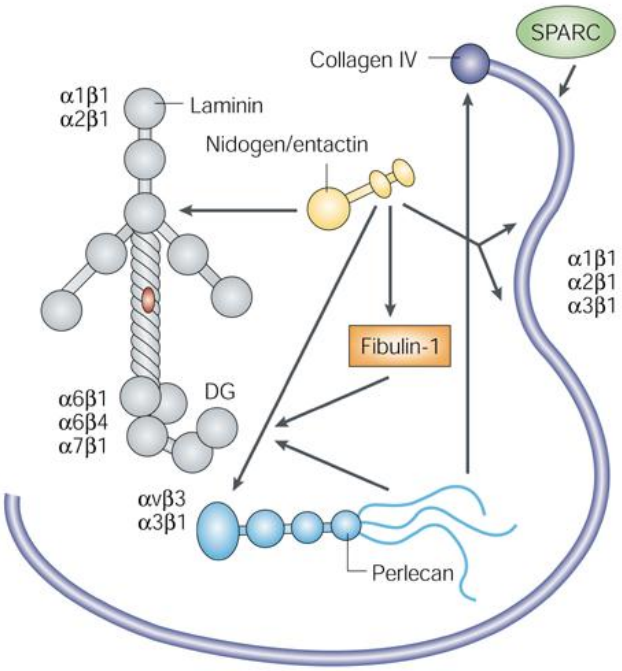


Figure 12 : Représentation des plaques d'adhésion focales. *(Extrait de Yuan, Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease : regulation of endothelial barrier function, 2010)(2).*



Basement-membrane collagen-derived endogenous inhibitors	Integrin binding
Arrestin (26 kDa)	α1β1
Canstatin (24 kDa)	αvβ3, α3β1
Tumstatin (28 kDa)	αvβ3, α6β1
Endostatin (20 kDa)	α5β1, αvβ3

Figure 13 : Interactions des composés de la membrane basale avec les intégrines. *(Extrait de Kaluri, Nat Rev Cancer, 2003)(35)*.

La MEC joue un rôle dans l'intégrité vasculaire en empêchant l'extravasation des cellules circulantes dans les tissus extravasculaires. Sous conditions pathologiques, des protéases sont sécrétées par cellules du stroma. Ces enzymes digèrent la MEC et rompent les plaques d'adhésion focales.

IV. Les interactions des cellules endothéliales avec les péricytes :

Les cellules musculaires lisses (CML) apparaissent majoritairement dans les grands vaisseaux alors que les péricytes sont associés aux artérioles, aux veinules et aux capillaires.

Comme les cellules musculaires, les péricytes contiennent des protéines fibreuses et contractiles permettant de stabiliser la paroi des vaisseaux en augmentant le contact entre les cellules endothéliales. Ils permettent également le contrôle de la prolifération des CE, la croissance des nouveaux capillaires et ils participent à la régulation du flux sanguin microvasculaire (pression, débit) et de la perméabilité capillaire. Ils sont capables de synthétiser différents composants de la MEC comme le collagène et les protéoglycanes et participent à l'élaboration de la lame basale.

Le recouvrement du vaisseau par les péricytes est une étape de maturation nécessaire afin d'obtenir un réseau vasculaire fonctionnel. Les CE secrètent du TGF-β1 (transforming growth factor beta) qui, après liaison avec son récepteur endogline, permet la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes (36). Les CE libèrent également du PDGF-B (platelet derived growth factor-B) qui agit de manière paracrine et favorise la prolifération et la migration des péricytes. A leur tour, les péricytes et CML (cellules périvasculaires ou cellules murales) libèrent de l'Ang-1 (angiopoïétine-1) qui va se fixer sur son récepteur Tie2 exprimé constitutivement pas les CE (Cf. figure 14).

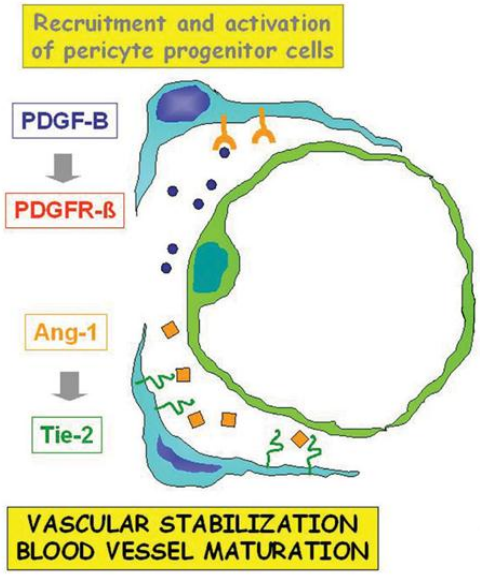


Figure 14 : Représentation des interactions ayant lieu entre les péricytes et les CE. *(Extrait de Ribatti, Int J Dev Biol, 2011)(37).*

V. Les principales fonctions de l'endothélium :

L'endothélium vasculaire est une barrière anatomique entre le sang circulant et la paroi du vaisseau et les autres tissus. Mais il produit également différentes molécules et joue ainsi un rôle essentiel dans la régulation de nombreux processus physiologiques comme l'hémostase, l'inflammation, la perméabilité vasculaire, le tonus vasculaire (Cf. figure 15). L'endothélium joue également un rôle dans la croissance vasculaire, fonction qui nous intéresse tout particulièrement dans ce travail de thèse et qui est détaillée dans la partie suivante de cette revue bibliographique.

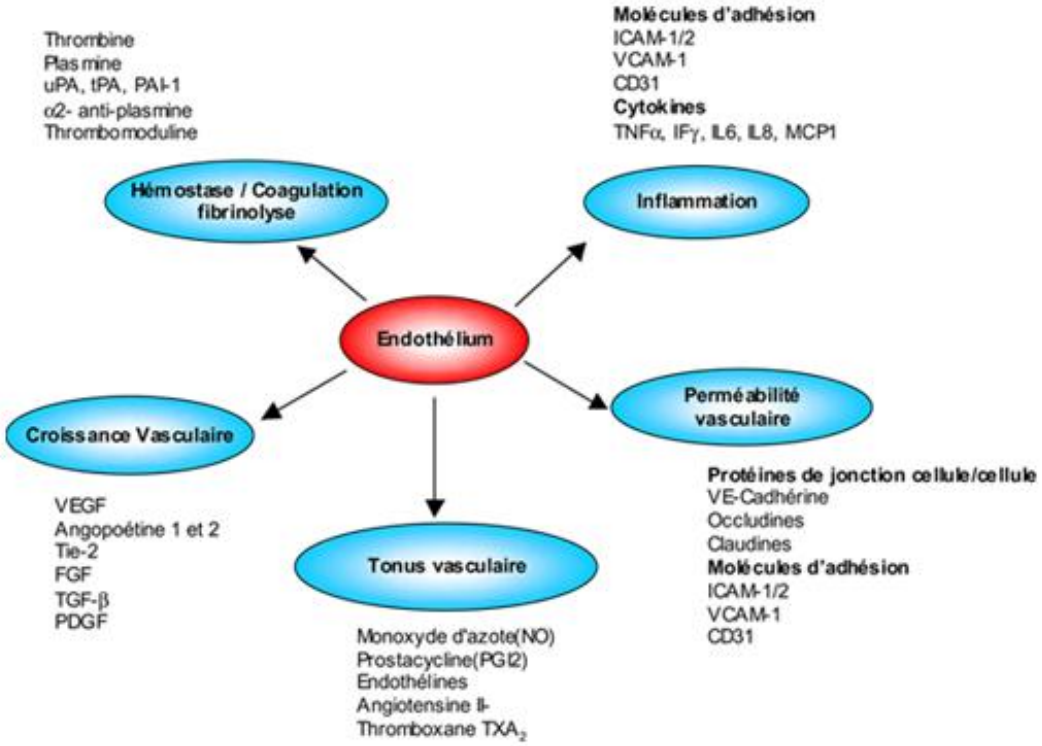


Figure 15 : Les différentes fonctions de l'endothélium vasculaire. *(Extrait de thèse Milliat 2007).*

PARTIE 2 :

L'angiogenèse : au départ, un phénomène physiologique

I. Les différents mécanismes de formation des vaisseaux sanguins :

Au tout début du développement de l'embryon, l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa croissance diffusent librement. Puis, au fur et à mesure que les besoins augmentent, la diffusion n'est plus suffisante et un réseau vasculaire primitif se met en place par un processus appelé vasculogenèse.

I.1. La vasculogenèse :

Lors de ce processus, les cellules mésenchymateuses précurseurs ou hémangioblastes prolifèrent et migrent pour former des amas cellulaires appelés îlots sanguins. Les cellules situées en périphérie de ces îlots sanguins se différencient en cellules endothéliales primitives alors que les cellules situées à l'intérieur de ces îlots forment les premiers globules rouges ou érythrocytes primitifs. Ainsi, après différenciation, un labyrinthe vasculaire appelé plexus vasculaire initial ou primitif est formé (Cf. figure 16).

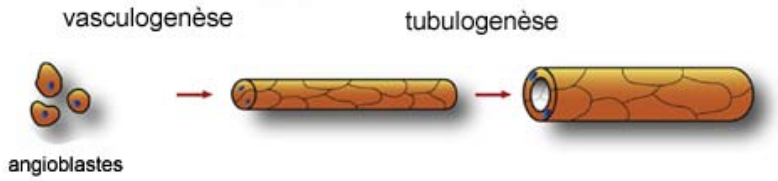


Figure 16 : Formation des vaisseaux par vasculogenèse et tubulogenèse. *(Extrait Xu, Tubulogenesis during blood vessel formation. Semin Cell Dev Biol, 2011)(38).*

Ce réseau primitif est ensuite complété par le mécanisme de tubulogenèse.

I.2. La tubulogenèse :

La tubulogenèse est un processus au cours duquel les précurseurs des cellules endothéliales organisés en cordon passent de la forme cuboïde à une forme aplatie. Ils réorganisent leurs points de jonction à la périphérie du cordon et permettent ainsi l'ouverture d'un espace entre ces cellules, espace à l'origine de la formation de la lumière du vaisseau ou lumen (Cf. figure 16).

Plusieurs mécanismes de formation du lumen ont été proposés :

- l'accumulation de sialomucine négativement chargée le long des membranes luminales opposées permet l'ouverture initiale d'un espace ressemblant à une fente entre les CE.

- des vacuoles formées à l'intérieur des cellules s'alignent au centre de la cellule et fusionnent avec celles de la cellule voisine pour créer un espace (39). Ce mécanisme est appelé « Cell hollowing » (Cf. figure 17).

- des vésicules d'exocytose libérées dans l'espace extracellulaire fusionnent et élargissent la lumière au centre du cordon (40). Ce mécanisme est appelé « Cord hollowing » (Cf. figure 17).

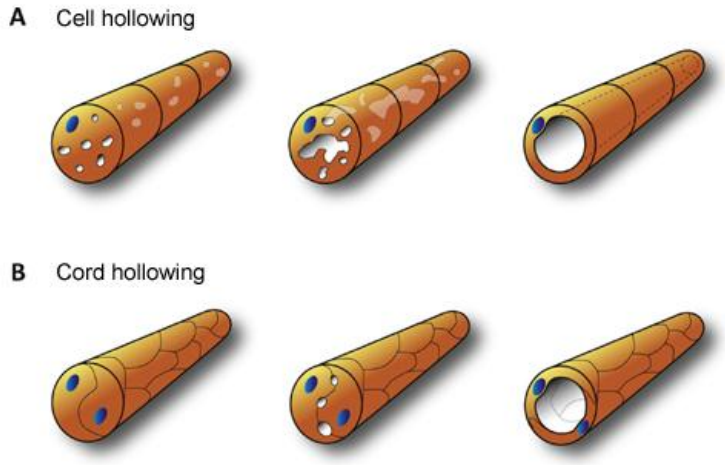


Figure 17 : Les différents mécanismes de tubulogenèse *(formation de la lumière des vaisseaux). (Extrait de Xu, Semin Cell Dev Biol, 2011)(38).*

Puis, l'expansion du réseau vasculaire s'effectue par le mécanisme d'angiogenèse.

I.3. L'angiogenèse :

Plusieurs mécanismes permettent la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un vaisseau pré-existant :

- l'angiogenèse par bourgeonnement : sous l'effet de différents facteurs de croissance, les cellules endothéliales d'un capillaire sortent de leur état de quiescence, se divisent et se mobilisent pour créer un bourgeonnement endothélial qui donnera lieu à un nouveau vaisseau. (Cf. figure 18 A). Ce processus est le plus connu et le plus fréquemment retrouvé en situation pathologique et sera détaillé au paragraphe III de cette partie.

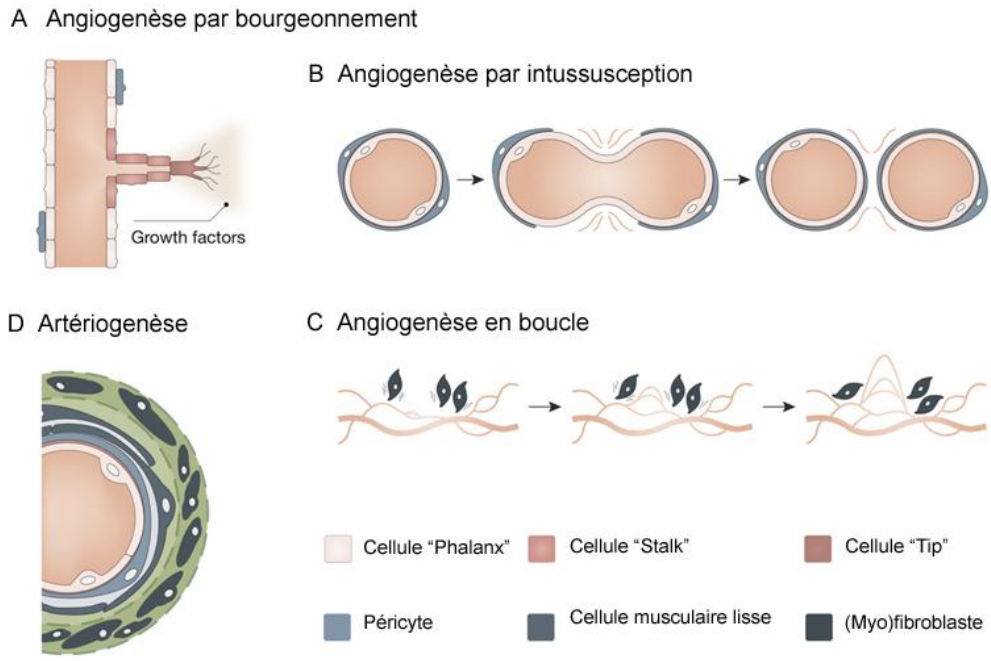


Figure 18 : Représentation des différents processus de formation des vaisseaux sanguins. *(Adapté de Leite de Oliveira, Molecular Aspects of Medicine, 2011) (41).*

- l'angiogenèse par intussuception, c'est-à-dire par division (Cf. figure 18 B). Le tissu de soutien exerce une pression localisée sur la paroi du vaisseau, l'allonge et divise le vaisseau en deux vaisseaux filles. C'est un mécanisme de formation rapide de nouveaux vaisseaux : les CE n'ont pas besoin de proliférer ni de migrer, elles ont juste besoin de se réorganiser. Le vaisseau reste fonctionnel tout le long du processus. L'intussusception angiogénique a lieu pendant le remodelage vasculaire, la vascularisation tumorale et le cycle menstruel (42).

- l'angiogenèse en boucle : ce mécanisme d'expansion vasculaire a été décrit pendant la réparation tissulaire et est également un processus rapide de formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels (43) (Cf. figure 18 C). Ce mécanisme est basé sur le concept des forces mécaniques qui régulent la croissance des vaisseaux comme le débit sanguin, la tension exercée par les tissus et les organes à l'extérieur du vaisseau et sur l'augmentation de la pression à l'intérieur des capillaires (44). Les myofibroblastes impliqués dans la reconstruction de la zone de contact lésée tirent les vaisseaux sanguins à proximité et entrent dans l'aire de remodelage comme un réseau de boucles.

Enfin, les vaisseaux se développent ensuite en diamètre et en épaisseur pariétale selon le processus appelé artériogenèse.

I.4. L'artériogenèse :

Cette étape supplémentaire de différenciation a lieu afin d'élargir le diamètre et la paroi des vaisseaux pour former les artères et les veines. La maturation de la paroi permet également l'ajout des différents composants du vaisseau comme les péricytes, la MB, les différentes lames élastiques, les spécialisations des CE en fonction du tissu ou de l'organe (comme par exemple les jonctions cellule-cellule et cellule-matrice, les fenestrations, les récepteurs, la différentiation artério-veineuse…) (Cf. figure 18 D).

Tous ces différents mécanismes permettent d'aboutir à un réseau vasculaire pleinement fonctionnel.
Seul le mécanisme d'angiogenèse par bourgeonnement sera détaillé dans la suite de ce document.

L'angiogenèse est nécessaire pendant tout le processus de reproduction (développement embryonnaire, implantation placenta, cycle menstruel) mais également lors de la réparation tissulaire et de la cicatrisation. Il est très ponctuel et ne dure pas longtemps (quelques mois lors de la reproduction, quelques jours lors de la cicatrisation). Les cellules entrent ensuite dans une phase dite de dormance encore appelée quiescence, à l'exception des organes reproducteurs. En dehors de ces cas, l'angiogenèse n'a plus lieu dans les tissus adultes sains mais peut apparaitre lors de maladies inflammatoires (comme la polyarthrite rhumatoïde, les rétinopathies diabétiques), des désordres de la peau (psoriasis, sarcome de Karposi, l'hémangiome) ou au cours du développement des cancers.

II. Le switch angiogénique :

La maintenance du système vasculaire est finement régulée par un ensemble de facteurs favorisant la formation de nouveaux vaisseaux appelés facteurs pro-angiogéniques et des facteurs empêchant cette formation appelés facteurs anti-angiogéniques. C'est la proportion entre ces deux types de signaux qui régit le système.

Lorsque les vaisseaux sont au repos, il y a un équilibre qui est établi entre ces facteurs pro- et anti-angiogéniques : on parle de balance angiogénique. Mais, lorsqu'il y a une nécessité de former de nouveaux vaisseaux, les proportions entre ces différents facteurs sont modifiées et contribuent à faire pencher cette balance en faveur d'une activité pro-angiogénique ; on parle de switch angiogénique (Cf. figure 19). De la même manière, la déstructuration des vaisseaux peut être obtenue après diminution des molécules pro-angiogéniques ou augmentation des molécules anti-angiogéniques.

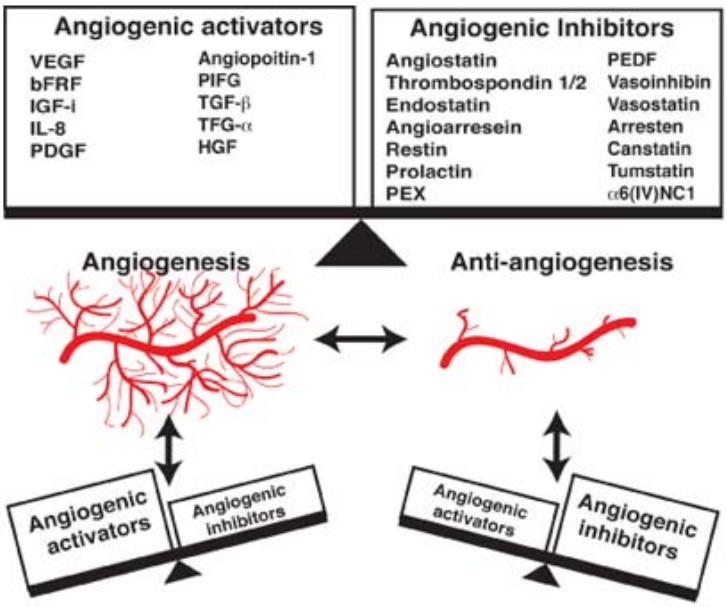


Figure 19 : La balance angiogénique *(Extrait de Sudhakar, JBB, 2009)(45).*

II.1. Les facteurs pro-angiogéniques :

De nombreuses molécules sont dites pro-angiogéniques car elles induisent différents processus impliqués dans l'angiogenèse. Leurs mécanismes d'actions sont résumés dans le tableau 1.

II.2. Les facteurs anti-angiogéniques :

Les principales molécules endogènes à activité anti-angiogénique proviennent de la dégradation de la membrane basale par différentes protéases ; d'autres sont sécrétées par les cellules endothéliales ou par le microenvironnement et agissent sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Cf. tableau 2).

Facteurs angiogéniques	Mécanismes d'action
Facteurs de croissance :	
Famille du VEGF	↑ la perméabilité vasculaire, ↑ la prolifération et la migration des CE
PlGF	↑ l'angiogenèse pathologique
Famille du FGF	↑ la prolifération et la migration des CE, ↑ l'activateur du plasminogène, ↑ les
Pléiotrophine	↑ la prolifération et la différenciation des CE
PDGF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE,
HGF/SF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
EGF / TGF-α	↑ la synthèse de facteurs pro-angiogéniques, prolifération des CE
TGF-β	Stabilisation des vaisseaux
EPO	Prolifération des CE
Système des angiopoïétines :	
Ang-1 et Tie-2	↑ la stabilisation des néovaisseaux, ↓ la perméabilité vasculaire
Ang-2 en présence de VEGF	Déstabilise les vaisseaux pour permettre la modification du réseau vasculaire
Médiateurs de l'inflammation et cytokines :	
TNF-α	↑ la différentiation des CE
IL-8	↑ la prolifération des CE
IL-3	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Prostaglandines E1, E2	↑ la différenciation des CE
IL-4	↑ la migration et la différenciation des CE
TGF-α	↑ la production de molécules de la MEC, du VEGF, de l'IL-8 et du PDGF
IGF-1	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE, induction du VEGF, ↑ l'activateur du plasminogène, ↓ l'apoptose des CE
Molécules de la MEC, molécules d'adhérence cellulaire, protéases matricielles et inhibiteurs :	
Gangliosides, acide	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
uPA et tPA / MMP	↑ le remodelage de la MEC, libère et active de nombreux facteurs de croissance
PAI	↑ la stabilisation des néovaisseaux en empêchant la dissolution de la MEC
PECAM	Molécule d'adhésion nécessaire à la survie des CE, migration des CE,
E-sélectine / ICAM-3	Molécules exprimées dans les néovaisseaux associés aux tumeurs, mécanismes
VE-Cadhérine	Stabilisation des vaisseaux, ↓ l'apoptose des CE
Intégrines	Interaction avec la MEC et les protéases, importante pour la migration des CE, liaison avec le VEGF, ↓ l'apoptose des CE
Oncogènes tumoraux :	
Ras	↑ la synthèse du VEGF et des TGF-α et Ŕβ, ↓ la synthèse de la TSP-1
P53	↑ la synthèse du VEGF, ↓ la synthèse de la TSP-1
Von Hippel Lindau	↑ la synthèse du VEGF
Autres :	
COX-2	↑ la vasodilatation
Angiogénine	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Adrénomédulline	↑ la vasodilatation, la prolifération et la migration des CE
Œstrogènes	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Proliférine	↑ la migration des CE

Tableau 1 : Liste des principaux facteurs pro-angiogéniques endogènes et leurs mécanismes d'action. *(Adapté de De Boüard Bull Cancer 2005 ; Distler Q J Nucl Med 2003)(46) (47).*

Facteurs angiostatique	Mécanismes d'action
Fragments protéiques :	
Angiostatine (fragment du plasminogène	↓ la prolifération et la migration, ↑ l'apoptose des CE
Endostatine (fragment du collagène XVIII)	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
Fragment de l'anti-thombine III	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
Prolactine 16 kDa	↓ la prolifération, ↓ angiogenèse induite par le FGF-2
Médiateurs solubles :	
Thrombospondine-1	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE
Troponine	↓ la prolifération des CE
Interféron-α	↓ la prolifération, ↑ l'apoptose des CE, ↓ angiogenèse induite par
Interféron-γ	↓ la prolifération des CE
TGF-β	↓ la prolifération et la migration des CE, ↓ les activateurs du plasminogène, ↑ TIMP, ↑ l'apoptose des CE
TNF-α	↓ la prolifération induit par FGF, ↑ l'apoptose des CE
Facteur Plaquettaire-4	↓ la prolifération, ↓ angiogenèse induite par le FGF-2 et l'IL-8
CXC chimiokines sans motifs ERL	↓ liaison FGF et VEGF sur leur récepteur
IL-12	↑ l'interféron-γ
IL-4	↓ la migration des CE
Inhibiteur du VEGF (VEGFl)	↓ la prolifération des CE
TIMP	↓ l'activité des MMP
PAI	↓ l'activité de l'uPA
MMP	Génère les fragments protéiques
Acide rétinoïque	↓ la migration des CE
Angiopoïétine-2	↓ la maturation des vaisseaux, antagoniste de l'ang-1,
PEDF	↓ la prolifération et la migration des CE

Tableau 2 : Liste des principaux facteurs anti-angiogéniques et leurs mécanismes d'action. *(Adapté de Distler Q J Nucl Med 2003 ; Scoazec Ann Pathol 2000 et thèse Noémie Thomas 2009, Nancy) (47) (48).*

III. Les différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement capillaire

La structure des vaisseaux est complexe. Les cellules endothéliales confinées dans le vaisseau sont endormies c'est-à-dire qu'elles sont en phase d'attente encore appelée quiescence. De plus, elles sont protégées par les péricytes et la membrane basale qui l'entourent. Plusieurs étapes sont donc nécessaires pour lever tous les obstacles, permettre un bourgeonnement endothélial et aboutir à un nouveau vaisseau fonctionnel :

Induction Déstabilisation	- émission du signal d'appel, - détachement des péricytes, - activation des cellules endothéliales, - sécrétion de protéases, - dégradation protéolytique de la MEC,
Bourgeonnement Elongation	- sélection des CE, - protrusion des CE, - migration chimiotactique des CE devant le bourgeon, - prolifération des CE derrière le bourgeon,
Stabilisation Maturation Remodelage	- formation de la lumière et des jonctions, - recrutement des péricytes et formation de la membrane basale, - induction de la quiescence, - amorçage du flux sanguin.

Ainsi, l'angiogenèse correspond à une cascade d'événements et nécessite un contrôle dans l'espace et dans le temps.

L'angiogenèse est également contrôlée par la quantité de nombreuses molécules intervenant dans ce processus et aussi par les interactions entre les différents partenaires mis en jeu à travers les contacts jonctionnels (CE, péricytes, tissu environnant) (Cf. tableau 3).

Evènement	Effet
	Induction de l'angiogenèse
Hypoxie	Réduction de la pression en oxygène. Stimule l'activation de HIF qui va activer la transcription de nombreux gènes comme le VEGF et les récepteurs.
	vasodilatation
NO / VEGF	Les deux conduisent à une vasodilatation et augmentent la perméabilité.
Ang-1	Inhibe la perméabilité.
	Dégradation de la membrane basale
Angiogenine	Participe à la lyse de la membrane basale.
MMP	Endopeptidase qui dégrade et remodèle la matrice extracellulaire.
	Différentiation et prolifération des CE
VEGF / Notch	Régule la différenciation et la prolifération des CE.
Ang-2	En présence de VEGF, facilite le bourgeonnement par déstabilisation du vaisseau pré-existant.
FGF-2	Favorise la synthèse de VEGF chez les CE, il agit en synergie avec VEGF pour favoriser la prolifération des CE, et module la différentiation des cellules.
	Migration des EC
FGF / VEGF	Chimioattractant pour les CE.
Angiogenine	Facilite la migration et l'adhésion à la matrice extracellulaire.
Molécules d'adhésion	Servent pour les interactions physiques avec la matrice extracellulaire, et initient ainsi le signal pour l'adhésion, la migration et le positionnement des CE.
	Réorganisation et stabilisation du réseau vasculaire
PD-ECGF	Favorise la stabilisation en attirant les péricytes vers l'endothélium.
VEGF	Avec ses interactions avec VEGFR-1, il joue un rôle dans la maturation et la structuration des vaisseaux nouvellement formés. Il régule également le diamètre de la lumière de ces vaisseaux.
Ang-1	Par sa liaison avec Tie-2, il remodèle les vaisseaux et stabilise les vaisseaux matures en interagissant avec le tissu environnant et contribue à la survie. En excès, il provoque un rétrécissement des vaisseaux et une inhibition de l'angiogenèse.
Ang-2	En absence de VEGF et quand il est lié à Tie-2, il déstabilise les vaisseaux formés et conduit à la mort cellulaire conduisant à la régression des vaisseaux. En présence de VEGF, il déstabilise les vaisseaux existant et induit le remodelage vasculaire.
SDF-1	En se liant au récepteur CXCR-4 il favorise la maturation du réseau vasculaire nouvellement formé. Il inhibe la formation de nouveaux vaisseaux.

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des facteurs impliqués dans les différentes étapes de l'angiogenèse. *(Extrait de Pousa, Rev Esp Enferm Dig, 2006)(49).*

III.1. Mécanisme d'induction et de déstabilisation de la paroi des capillaires

Les vaisseaux sanguins transportent l'oxygène nécessaire aux différentes cellules de l'organisme, lequel diffuse vers les tissus ; c'est pourquoi la quantité d'oxygène (ou pression partielle en oxygène) diminue lorsque l'on s'éloigne des vaisseaux. Lorsque les cellules sont trop éloignées des vaisseaux sanguins (>100µm) (ou zone avasculaire), elles sont en manque d'oxygène (<5% O_2). Cet état est appelé hypoxie. Les cellules développent alors une réponse adaptative permettant d'augmenter les apports nutritionnels et gazeux en formant de nouveaux vaisseaux qui vont pouvoir venir irriguer ces zones, l'angiogenèse est alors déclenchée.

III.1.a. Induction par l'hypoxie :

La réponse adaptative des cellules en hypoxie est médiée par le facteur inductible par l'hypoxie HIF-1α (50). HIF est un complexe hétérodimérique sensible à l'oxygène :

- Lorsque la pression en oxygène est normale (ou normoxie), les sous-unités cytoplasmiques HIF-1α et HIF-2α ont une durée de vie très courte. Elles subissent des modifications par la prolyl hydroxylase (PHD) (51) ce qui augmente l'affinité de HIF-1α pour la protéine de von HippelŔLindau (pVHL), protéine du complexe ubiquitin ligase E3 permettant de marquer les protéines devant être dégradées (Cf. figure 20). HIF-1α est alors ubiquitinylé et ensuite éliminé par le complexe du protéasome. L'acétylation d'HIF-1α par l'arrest defective-1 protein (ARD1) est également nécessaire pour une reconnaissance complète par pVHL (52).

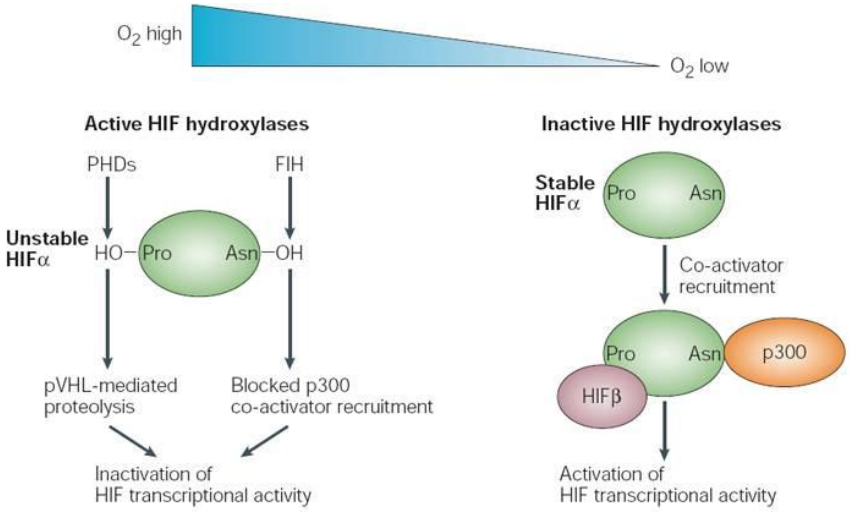


Figure 20 : Contrôle de l'activité de HIF par la pression tissulaire en oxygène. *(Extrait de Schofield, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004) (53).*

- Par contre, lorsque les cellules sont privées d'oxygène (en hypoxie), l'enzyme PHD a une activité réduite. Ainsi, HIF-1α et HIF-2α s'accumulent dans le cytoplasme et peuvent rentrer dans le noyau où ils se dimérisent avec HIF-1β et activent la transcription des gènes cibles possédant l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau de leur région promotrice (Cf. figure 21).

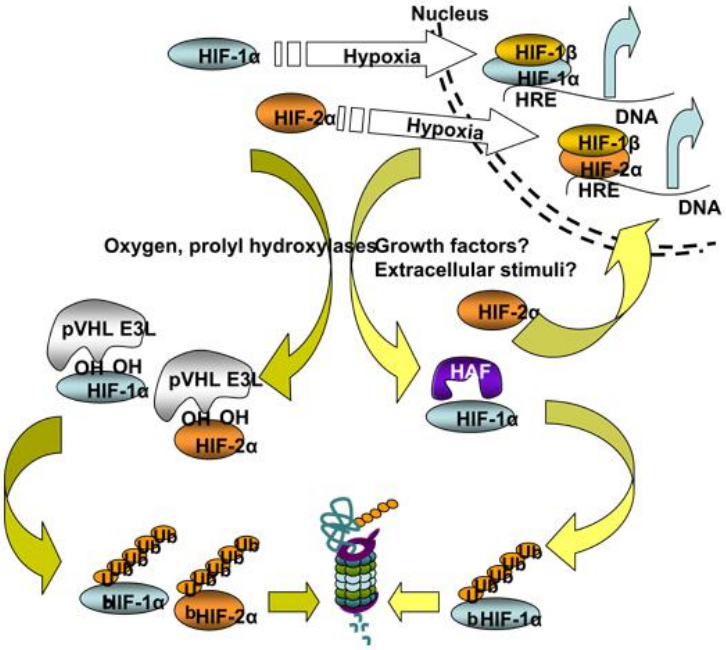


Figure 21 : Mécanisme de dégradation de HIF-1α *(extrait du site internet : http://www.mdanderson.org/education-and-research/departments-programs-and-labs/labs/powis-laboratory/current-research/index.html).*

De plus, en normoxie, HIF-1α peut être hydroxylé (dans le domaine C-terminal) ce qui l'empêche de se lier correctement à son élément de réponse HRE (54-55), d'autres modifications post-traductionnelles sont également capables d'inhiber la transcription de gènes par HIF-1α (56-58).

Les gènes activés par l'hypoxie codent pour des protéines permettant (Cf. Figure 22) :

- de modifier le métabolisme des cellules et ainsi de passer d'une respiration aérobie (métabolisme du glucose) à une respiration anaérobie avec production d'acide lactique (59).

- d'aider les cellules à survivre dans un environnement acide en régulant certains gènes nécessaires pour l'homéostasie du pH (60).

- de contrecarrer la privation d'oxygène en agissant sur le transport de l'oxygène (comme l'érythropoïétine) ou dans la libération du fer (comme la transferrine).

- de moduler le tonus vasculaire comme la nitric oxide synthase 2 (NOS-2) (61).

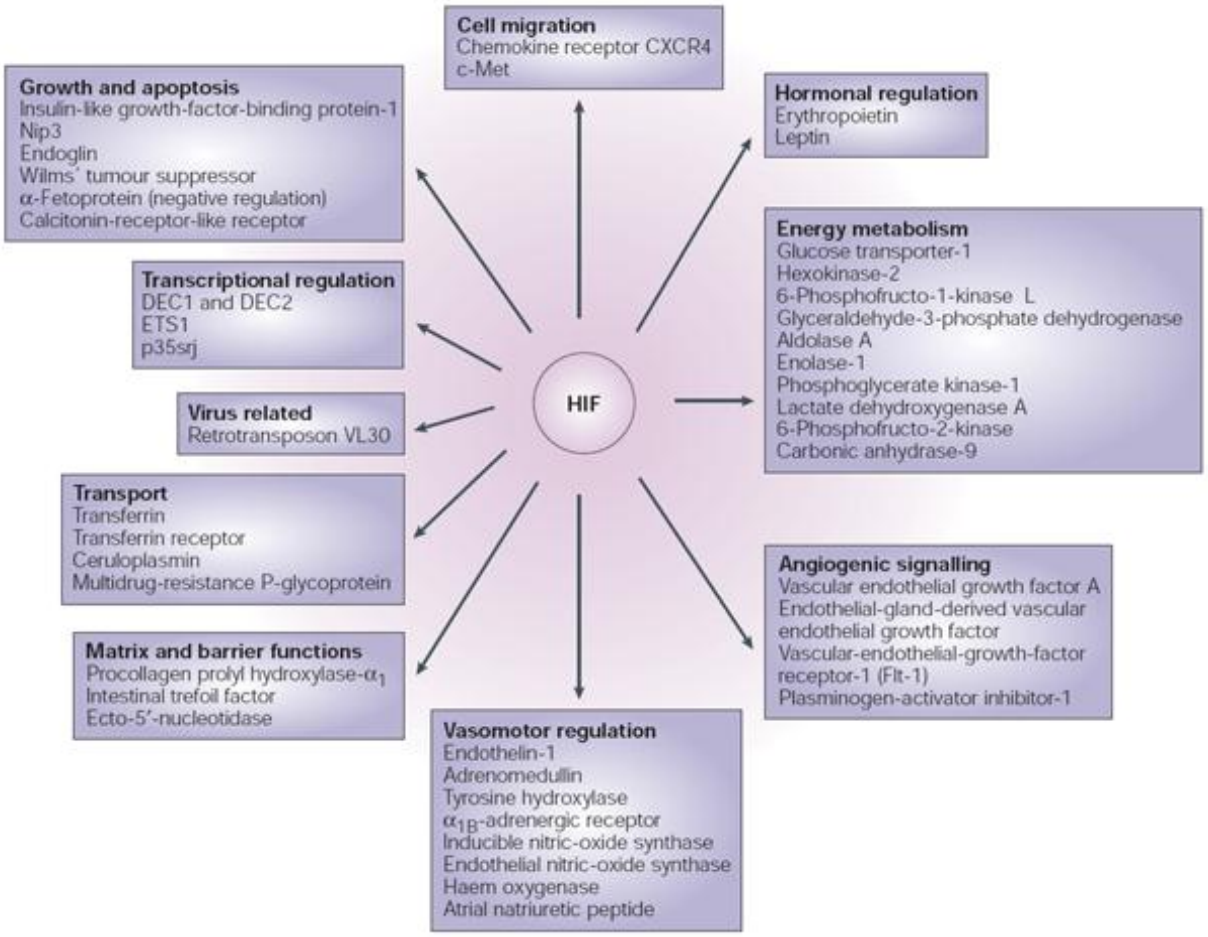


Figure 22 : Les cibles directes de HIF *(extrait de Schofield, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004)(53).*

L'hypoxie régule également l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, comme :

- des métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice (62), ou de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI) (60, 63-64).

- des facteurs de croissance permettant la prolifération et la survie des cellules avec, par exemple, l'insuline (IGF-2 insulin-like growth factor-2) (65) et le transforming growth factor-α (TGF-α) (64,66).

- le VEGF, principal facteur à activité pro-angiogénique par un mécanisme qui augmente la stabilité de son ARNm (acide ribonucléique messager) (67).

- les récepteurs du VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) sont également surexprimés lors de l'hypoxie par un mécanisme post-transcriptionnel tel que l'augmentation de la stabilité des ARNm (67) ou après libération d'un facteur paracrine par les tissus ischémiés (68).

- enfin, d'autres facteurs pro-angiogéniques ne possédant pas l'élément de réponse HRE dans leur promoteur sont régulés indirectement par l'hypoxie comme le FGF, et les angiopoïétines (60).

III.1.b. Déstabilisation de la paroi capillaire : sortie de la quiescence endothéliale

La formation d'un nouveau vaisseau à partir d'un vaisseau préexistant nécessite de déstabiliser le vaisseau mère. Cette déstabilisation dépend de divers facteurs produits par les cellules de l'environnement en hypoxie comme le monoxyde d'azote (NO), le VEGF et l'angiopoïétine, ou par les péricytes et la matrice extracellulaire en agissant sur l'intégrité des contacts jonctionnels des CE.

III.1.b.1. Rôle du NO :

Le NO libéré lors de l'hypoxie est un puissant vasodilatateur. Il agit sur le cytosquelette en modifiant la β-caténine (par S-nitrosylation) pour permettre le passage de macromolécules et favoriser la perméabilité induite par le VEGF (1). La vasodilatation provoque un élargissement des vaisseaux conduisant à un détachement des péricytes et à une altération des jonctions entre les cellules endothéliales (Cf. figure 23). De plus, l'augmentation de la perméabilité conduit à l'extravasation de protéines dont la fibrine qui va pouvoir créer une matrice provisoire qui servira de support au bourgeon du vaisseau en formation.

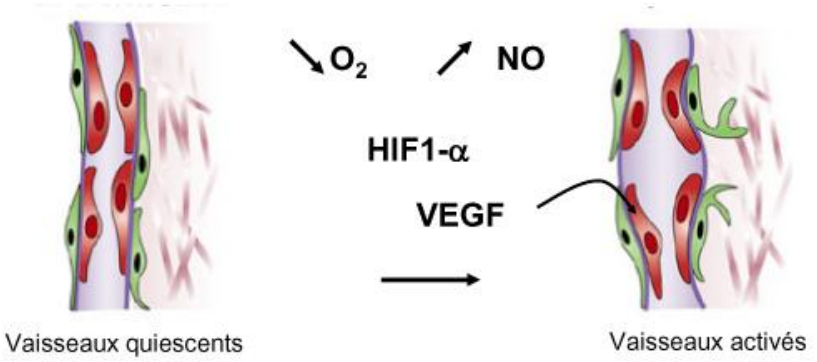


Figure 23 : Déstabilisation de la paroi et sortie de la quiescence. *(Extrait de Bergers, Nat Rev Cancer, 2003) (69).*

III.1.b.2. Rôle du VEGF :

Le VEGF est libéré lors du signal d'appel donné par l'hypoxie. Il se fixe alors sur son récepteur possédant une activité tyrosine kinase (VEGFR-2). Cette fixation provoque

l'autophosphorylation subséquente des différents résidus tyrosine situés dans le domaine cytoplasmique du récepteur et conduit à (Cf. figure 24) :

- la phosphorylation de la VE-Cadhérine par la kinase Src induisant la rupture des jonctions adhérentes et une redistribution cellulaire par endocytose (70,71),

- l'activation de la voie de signalisation MAPK nécessaire à l'ouverture des jonctions,

- l'activation de la voie de signalisation PI3K conduisant à la production de NO et augmentant ainsi la perméabilité vasculaire.

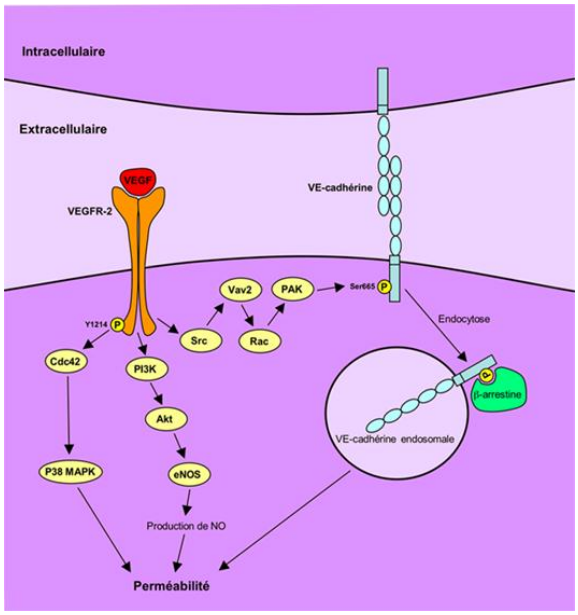


Figure 24 : Rôle du VEGF dans la perméabilité vasculaire. *(Extrait thèse Wallez, 2007).*

Le VEGF induit également la phosphorylation d'autres protéines jonctionnelles comme l'occludine et la zona occludens des jonctions serrées. Ainsi, les contacts cellulaires sont déstabilisés et la perméabilité est augmentée (72, 73). Les cellules ne sont plus attachées les unes des autres et peuvent ainsi migrer.

III.1.b.3. Rôle des angiopoïétines :

Le récepteur Tie-2 est impliqué dans la régulation de l'état de quiescence des CE.

Lorsque les cellules endothéliales sont jointives, la liaison de son ligand produit par les péricytes, l'angiopoïétine-1 (ang-1), conduit à la migration du récepteur Tie-2 au niveau des contacts entre les cellules endothéliales et conduit à une inhibition de la prolifération et à un signal de survie et de protection contre l'apoptose ; l'état de quiescence est alors activé (Cf.

figure 26). La phosphorylation du facteur de transcrition Foxo (forkhead transcrition factor) par AKT (serine threonine protein kinase) le rend inactif et régule négativement l'expression d'ang-2, autre ligand du récepteur Tie (74).

Mais, lorsque les contacts sont rompus (c'est-à-dire quand les cellules ne sont pas jointives), ang-1 peut se lier à la matrice et induire la localisation de Tie-2 au niveau des contacts cellule-matrice activant les voies de signalisation conduisant à l'adhésion des CE à la matrice, à leur migration et favorise ainsi l'angiogenèse (75) (Cf. figure 25).

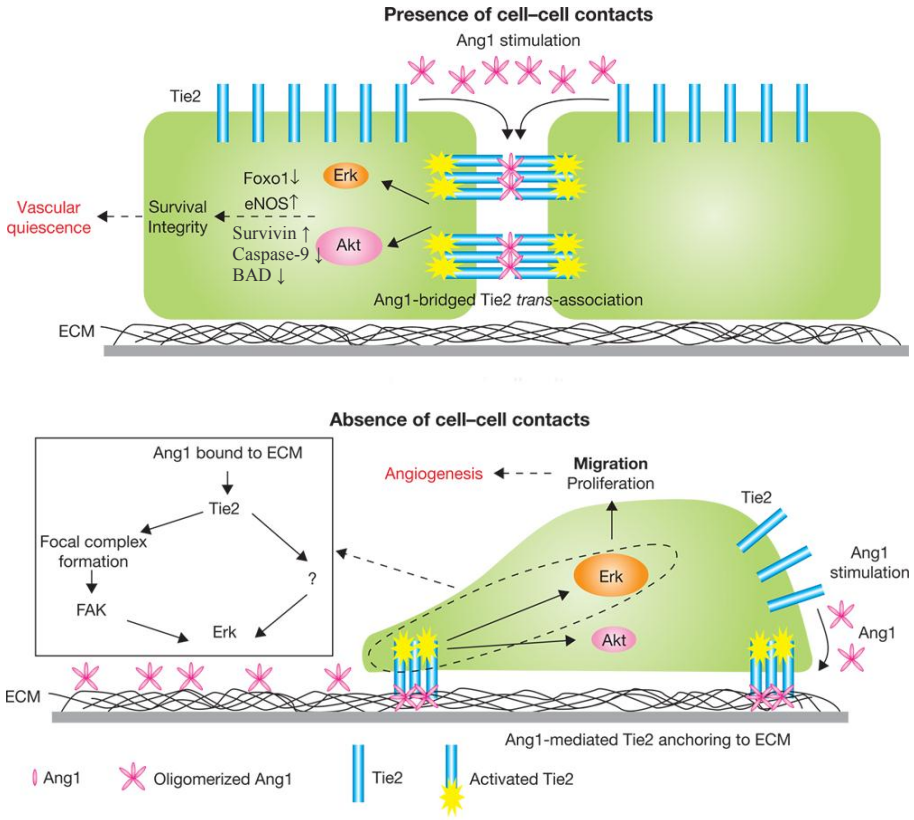


Figure 25 : Représentation des voies de signalisation impliquées dans l'état de quiescence des CE *(Adapté de Fukuhara, Nat Cell Biol, 2008 et de Augustin, Nat Rev Mol Cell, 2009)(76) (74).*

Ainsi, la surexpression précoce de l'angiopoïétine-2 (Ang-2) produit par les CE lors du signal d'appel donné par l'hypoxie rentre en compétition avec Ang-1 pour la liaison sur le récepteur Tie-2. Dans un premier temps, les vaisseaux régressent mais sous l'induction du VEGF, l'angiogenèse est initiée (77, 78).

De plus, en présence de VEGF, l'angiopoïétine-2 induit le détachement des péricytes conduisant à une déstabilisation des vaisseaux (79) (Cf. figure 26).

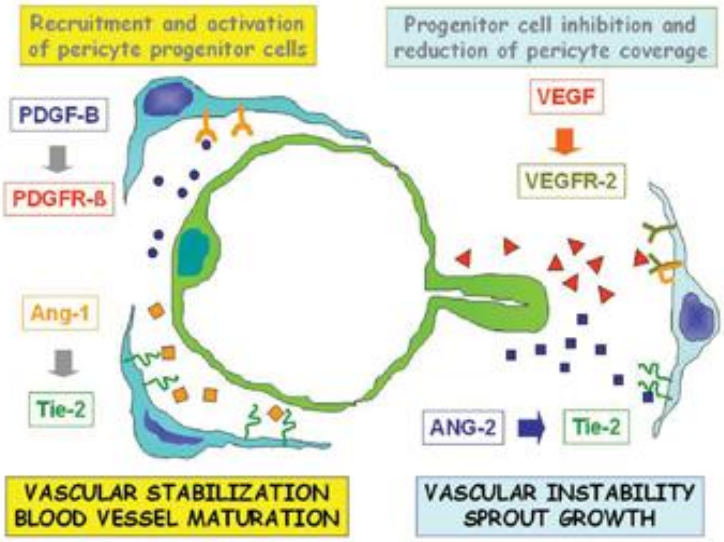


Figure 26 : Rôle des angiopoïétines dans la stabilité des vaisseaux. *(Extrait de Ribatti, Int J Dev Biol, 2011)(37).*

L'état de quiescence est levé. L'endothélium se trouve alors exposé aux différents facteurs présents dans le milieu environnant. Les cellules CE sont activées et peuvent répondre aux différents stimuli qu'elles reçoivent.

III.2. Mise en place du bourgeonnement endothélial

III.2.a. Dégradation de la matrice extracellulaire :

Une étape déterminante pour le bourgeonnement est le désassemblage de la barrière qui restreint la migration des CE. Cette barrière est composée de la MB et MEC et comporte différents types de collagène, des fibres élastiques, des protéoglycanes et des glucosaminoglycanes (GAGs) aussi bien que de nombreuses glycoprotéines servant de colle pour tous ces composés (Cf. partie 1, paragraphe III).

Lors du détachement des péricytes de la paroi des vaisseaux, les récepteurs présents à la surface des CE deviennent accessibles au VEGF, lequel induit notamment la synthèse de protéases capables de dégrader la MB et la MEC (80, 81). Ces enzymes appartiennent à la famille des métalloprotéases de la matrice (MMP) et des activateurs du plasminogène.

Les MMP sont des endopeptidases généralement spécifiques d'un substrat comme le collagène ou la gélatine (2). Elles peuvent être sous forme soluble ou exprimées à la surface des cellules (MMP de type membranaire ou MT-MMP). Synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives, les MMP sont activées après clivage d'un domaine par une enzyme

protéase déjà activée (82). Ainsi une MMP est capable d'activer une autre MMP et conduit à la dégradation de l'ensemble des composés de la MEC (Cf. figure 27 ci-dessous).

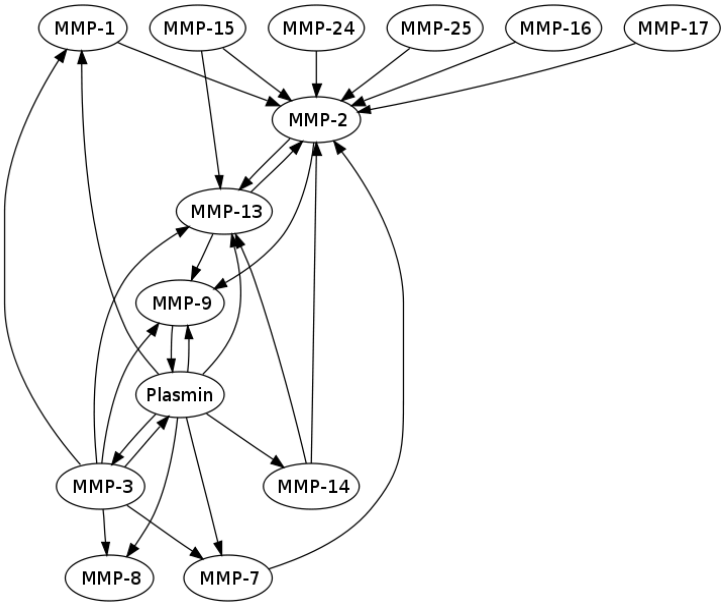


Figure 27 : Activation des MMP. *(Extrait du site internet Wikipédia* http://en.wikipedia.org/wiki/File:Mutual_MMP_activation.svg*)*

Le plasminogène, extravasé dans le milieu périvasculaire lors de la déstabilisation de la paroi, est transformé en plasmine sous l'action de l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA) et de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) séquestrés dans la matrice. La plasmine est une sérine protéase capable d'activer la plupart des MMPs et ayant également une action protéolytique propre sur différentes protéines matricielles comme la fibronectine, la laminine, le collagène IV ou la fibrine. La plasmine est également capable d'inhiber les TIMPs (inhibiteur tissulaire des MMP). Le PAI-1 (inhibiteur de l'activateur du plasminogène) inhibe la transformation du plasminogène en plasmine et joue donc un rôle dans la régulation du système.

La dégradation de la MEC autour des cellules vasculaires endothéliales en phase d'invasion est contrebalancée par une protection de cette matrice d'une lyse excessive par l'action d'inhibiteurs solubles tels que les TIMP ou les inhibiteurs membranaires (83). De même, la compartimentation des MMP à la surface des CE limite la protéolyse à l'espace péricellulaire et restreint la dégradation de la matrice au niveau du bourgeon (Cf. figure 28).
De plus, la MEC interagit de manière mécanique avec les CE et peut ainsi réguler l'expression de protéases des cellules au niveau du bourgeon et conduire à sa dégradation (84-

85). De même, la MB restreint l'activité des CE à un état anti-prolifératif. Une fois la membrane basale dégradée, les CE vont pouvoir commencer à proliférer et à s'infiltrer dans l'espace extravasculaire tout en digérant la matrice.

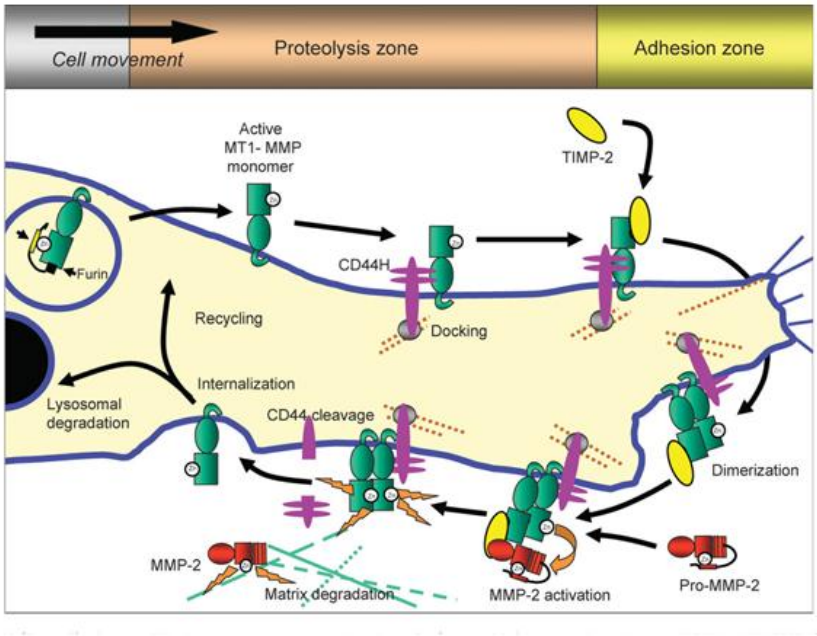


Figure 28 : Représentation de l'activation des MMP à la surface des CE en phase d'invasion. *(Extrait de van Hinsbergh, Cardiovasc Res, 2008) (86).*

III.2.b. Protrusion et migration des CE :

Le VEGF généré au cours de l'hypoxie diffuse dans le tissu environnant à partir de la zone ischémiée vers les vaisseaux les plus proches créant ainsi un gradient de concentration (87) ; il est également libéré lors de la dégradation de la matrice. Libérés de la matrice, les récepteurs endothéliaux deviennent accessibles aux divers stimuli du milieu environnant comme le VEGF. Les cellules endothéliales ainsi activées commencent alors la formation du bourgeon. Cette phase est réalisée par des cellules spécialisées et peut être décomposée en plusieurs étapes :

- sélection des CE en fonction de leur phénotype,
- migration des CE vers la source du stimulus,
- prolifération des CE permettant d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour former les nouveaux vaisseaux fonctionnels (Cf. figure 29)

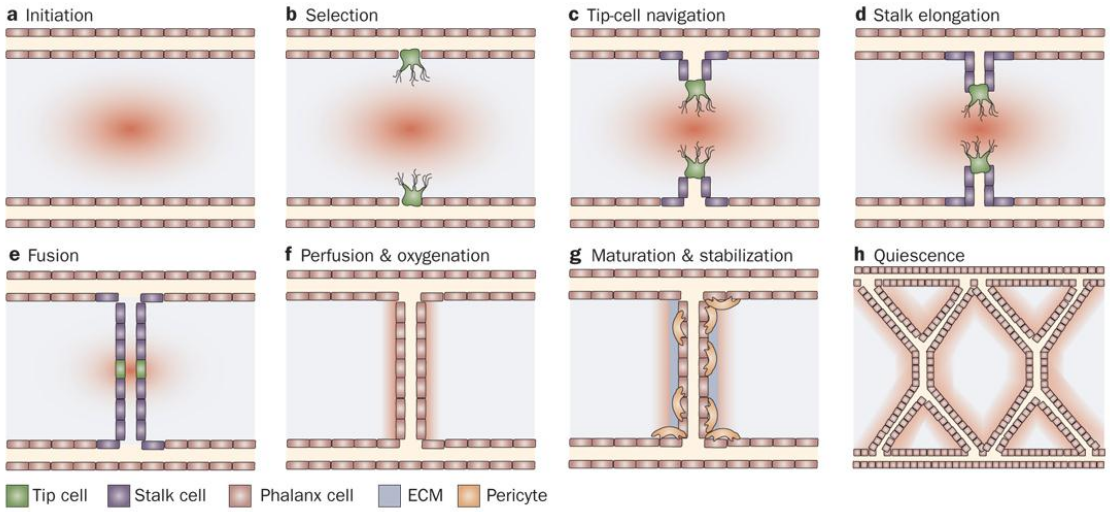


Figure 29 : représentation des différentes étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement. *(Extrait de Carmeliet, Nature Review Clinical Oncology, 2009)(88).*

III.2.b.1. Les différents phénotypes endothéliaux :

Les cellules « tip »:

Des cellules particulières sont sélectionnées pour former l'extrémité du bourgeon et sont communément appelées « tip » (Cf. figure 30). Ces cellules « tip » répondent aux facteurs de croissance, s'activent, prennent une forme polarisée et deviennent mobiles. Elles émettent de fins et longs prolongements appelés filopodes qu'elles utilisent pour percevoir l'environnement et pour être guidée par le VEGF vers la source du stimulus. Ces cellules prennent donc la tête du bourgeon en croissance pour guider le vaisseau en formation vers la région avasculaire.

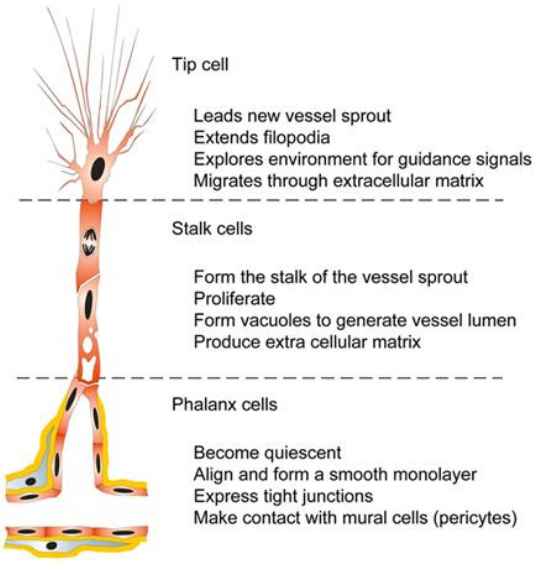


Figure 30 : Les différents phénotypes des CE dans un vaisseau en formation. *(Extrait du site internet http://www.ocular-angiogenesis.nl/Angiogenesis/Angiogenesis.html).*

Les cellules « stalk »:

Les CE qui suivent en dessous du bourgeon sont appelées cellules « stalk » et font le lien entre les cellules « tip » et le vaisseau mère. Ces cellules « stalk » ne produisent pas de filipode mais prolifèrent sous la stimulation du VEGF (87) (Cf. figure 30) et restent connectées au vaisseau mère. Ces cellules forment la lumière du vaisseau (par formation de vacuoles) et établissent les différentes jonctions pour maintenir l'intégrité du vaisseau (89) et la polarité conduisant au dépôt de la lame basale et à l'attachement des cellules murales.

Les cellules « phalanx »:

Les cellules appartenant au vaisseau initial et situées à la base du bourgeon sont appelées cellules « phalanx » (Cf. figure 30). Ces cellules ne prolifèrent pas et deviennent quiescentes, s'alignent, expriment les jonctions serrées et entrent en contact avec les cellules murales (90).

III.2.b.2. La sélection du phénotype endothélial:

La spécialisation des CE est régulée par la signalisation Notch/dll-4 (9, 91). Au départ, les CE ont toutes le même phénotype et expriment les récepteurs VEGFR-2 et Notch. Le VEGF, issu du gradient de concentration, se lie à son récepteur VEGFR-2 présent à la surface des CE et active l'expression de Dll-4 dans ces cellules (Cf. figure 31). Dll-4 se lie à son récepteur Notch exprimé par les cellules adjacentes (87) et induit une régulation négative de l'expression de VEGFR-2 dans ces cellules (9, 92-93) et provoque ainsi une diminution de la libération de Dll-4 dans ces cellules. Cette régulation négative de VEGFR-2 empêche ces cellules de répondre au signal donné par le VEGF.

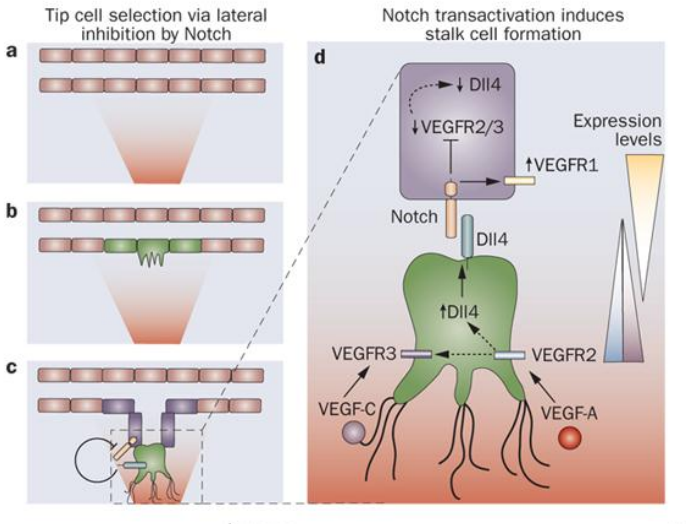


Figure 31 : Représentation du mécanisme de sélection des différents phénotypes endothéliaux. *(Extrait de Carmeliet, Nature Review Clinical Oncology, 2009) (88).*

Les cellules endothéliales stimulées par le VEGF rentrent donc en compétition pour devenir des cellules « tip ». La cellule qui exprimera plus de Dll4 que ses voisines deviendra « tip » (phénotype pris par défaut en absence de signalling de Notch) (91, 94). Les autres cellules ayant subit l'activation de Notch deviendront « stalk ».

La voie de signalisation Eph/Ephrine est également impliquée dans la sélection des cellules « tip » : l'expression d'éphrin-B2 est régulée positivement par le VEGF-A, VEGFR-2 et notch et son expression est retrouvée sur les cellules menant le bourgeon (cellules « tip ») (Cf. figure 32 en rose) alors qu'EphB4 est retrouvée à la base du bourgeon (cellules « stalk ») (Cf. figure 32 en bleu) (95). Cette signalisation est impliquée dans la régulation négative de VEGFR-2 par endocytose mais les mécanismes ne sont pas très bien connus.

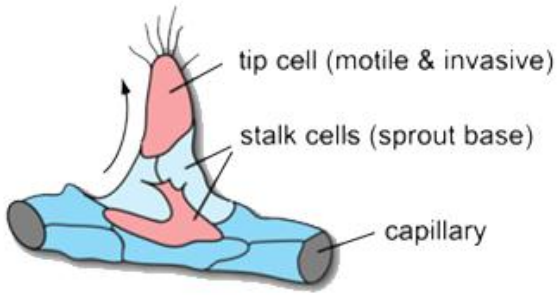


Figure 32 : Expression d'Ephrine-B2 et Eph-B4 au niveau des cellules angiogéniques. *(Extrait de Pitulescu, Gene Dev, 2010) (95).*

Le phénotype de ces cellules endothéliales n'est pas figé dans un type particulier mais peut évoluer de manière dynamique. La boucle de rétro-contrôle formée par les voies de signalisation du VEGF et de Notch réduit la capacité des cellules à devenir des cellules meneuses à quelques cellules et permet ainsi d'éviter un développement excessif du réseau vasculaire (88) où la stabilité des vaisseaux pourrait être perdue (9).

Après mise en place des cellules « tip », la formation du capillaire nécessite une étape de migration et de prolifération des cellules endothéliales permettant la croissance du capillaire en longueur jusqu'à la zone hypoxique. Pour cela, les cellules « tip » migrent par chimiotactisme vers la source du stimulus tandis que les cellules « stalk » se divisent pour fournir le nombre nécessaire de cellules. Ces cellules sont en contact étroit avec les molécules de la matrice et, pour pouvoir se déplacer, elles doivent alternativement établir et casser les contacts focaux d'adhérence avec la matrice extracellulaire.

III.2.b.3. Rôle de la matrice extracellulaire :

Les protéines de la matrice servent de support aux CE pendant leur migration par le biais de leurs interactions avec les intégrines présentes à la surface de ces cellules (96). Lors de la dégradation de la matrice, certaines protéines matricielles comme le collagène sont clivées et de nouveaux sites de liaison apparaissent, les propriétés d'interactions avec les intégrines sont alors modifiées. Par exemple, la coupure protéolytique du collagène IV, initialement lié à l'intégrine α1β1, laisse apparaître un site de fixation à l'intégrine αvβ3. De même, la MMP-2 coupe le collagène I de façon à créer un site de fixation pour l'intégrine αvβ3. Cette protéase étant localisée au niveau des sites d'invasion, elle permet ainsi la migration cellulaire en direction du stimulus angiogénique (97).

Les protéines de la matrice, par leurs interactions avec les intégrines, sont également impliquées dans la prolifération cellulaire. Par exemple, le collagène IV induit la prolifération et la migration des CE après liaison avec les intégrines α1β1 et α2β1 mais lorsqu'il est dégradé par les MMP, la liaison avec ces intégrines est fortement diminuée mais, grâce à sa liaison avec l'intégrine αvβ3, le collagène IV inhibe la prolifération des CE (35).

La dégradation de la MEC par les protéases permet également la libération de facteurs angiogéniques séquestrés dans cette matrice par leur domaine de liaison à l'héparine comme par exemple le FGF-2, le VEGF ou le TGF-β. Ces facteurs activent différentes voies de signalisation cellulaire comme la survie, la prolifération et la migration.

III.2.b.4. Rôle des principales voies de signalisation

angiopoïétines/Tie2

Ang-1, par sa forte affinité avec la fibronectine, le collagène et la vitronectine et à sa plus faible affinité avec la laminine et le fibrinogène, participe physiquement à l'adhésion à la MEC et favorise ainsi la migration des CE.

De plus, Tie-2 est un récepteur à activité tyrosine kinase et la liaison du ligand induit une cascade de phosphorylation ayant des conséquences sur la migration et la prolifération cellulaire, la perméabilité vasculaire, la maturation des vaisseaux et l'inflammation (Cf. figure 33).

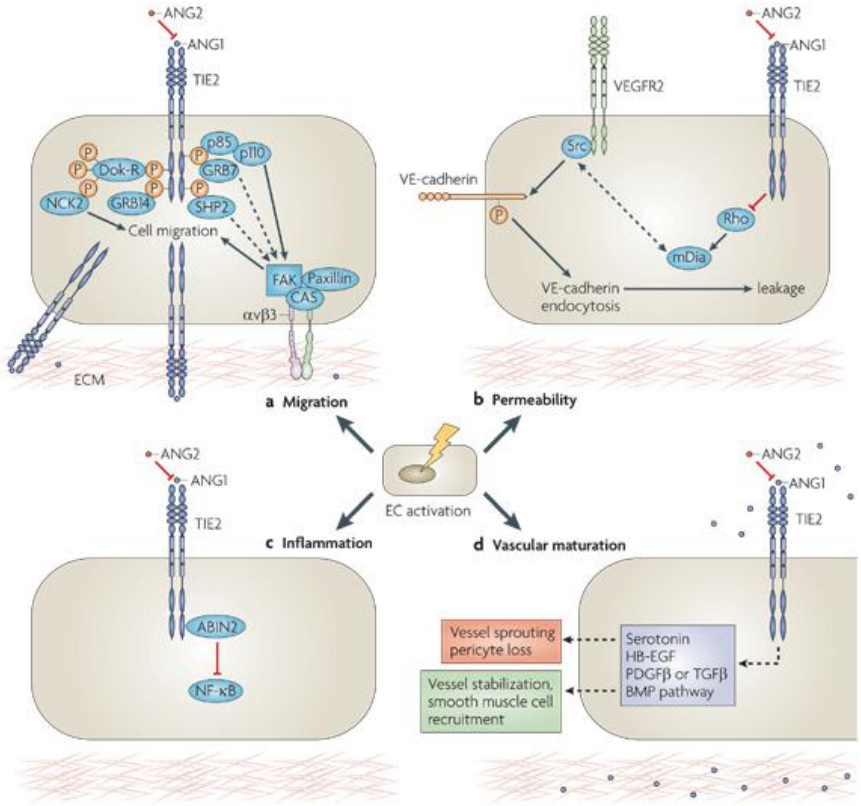


Figure 33 : Représentation des différentes voies de signalisation du récepteur Tie. *(Extrait de Augustin, Nat Rev Mol Cell, 2009) (74).*

VEGF/VEGFR-2

L'activation du récepteur VEGFR-2 conduit au recrutement et à l'activation de la protéine kinase Src et induit une cascade de phosphorylation activant des molécules effectrices en aval du signal. Différentes voies sont ainsi régulées et conduisent : (Cf. partie 1, paragraphe I.3.a)

- à la migration des CE par activation des protéines tyrosine kinase situées aux contacts focaux et induit le réarrangement du cytosquelette (actine) permettant à la cellule de se mouvoir,

- à la prolifération cellulaire par activation de la phospholipase Cγ (PLC-γ) qui déclenche une cascade d'événements produisant des messagers lipidiques secondaires capables d'activer la protéine kinase C (PKC),

- à la survie par activation de la voie PI3K, laquelle permet la production de phosphatidyl inositol triphosphate (PIP3) permettant l'activation d'Akt et abouti à l'inhibition de l'apoptose et à la stimulation de la survie cellulaire.

D'autres facteurs de croissance sont impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire comme le FGF-2 : ce facteur stimule l'expression des intégrines et coopère avec le VEGF lors des phases de prolifération et de migration.

VE-cadhérines :

Sur la membrane cellulaire, la VE-cadhérine se trouve à proximité du récepteur VEGFR-2 et agit indirectement sur la prolifération cellulaire.

Le domaine cytoplasmique de la VE-Cadhérine est relié aux protéines du cytosquelette et aux microtubules (28) par interaction avec différentes protéines cytoplasmiques dont le facteur de transcription β-caténine (27). La protéine kinase Src constitutivement associée à la VE-cadhérine est activée par le VEGF et induit la phosphorylation du résidu tyrosine Y685 de la VE-cadhérine (98). La β-caténine n'est plus liée à la VE-cadhérine et peut alors jouer son rôle de facteur de transcription notamment en induisant l'expression de gènes codant pour la cycline D1 et myc, ce qui induit l'entrée de la cellule dans le cycle cellulaire (13). Les jonctions étant désorganisées, le récepteur VEGFR-2 peut être activé et induit la prolifération tandis que les fonctions anti-apoptotiques du récepteur sont fortement réduites.

De plus, La VE cadhérine agit également sur la transmission du signal en interagissant avec les Rho-GTPases (hydrolase à guanosine triphosphate de la famille de Rho) (Rho, Rac et Cdc42) (99) impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine. En effet, les GTPases Rho interagissent avec la membrane plasmique de façon très localisée, et permettent une polymérisation ciblée du cytosquelette d'actine et sont capables de promouvoir la formation de fibres de stress et l'assemblage des contacts focaux (100). Les protéines Rac1 et Cdc42 induisent respectivement la formation de lamellipodes et de filopodes (100, 101).

DLL-4/Notch :

Après liaison avec son ligand Dll-4, le récepteur Notch subit plusieurs attaques par les enzymes TACE et γ-secrétase ce qui conduit à la libération, entre autre, du domaine intracellulaire de Notch (NICD). NICD est ensuite transloqué dans le noyau et permet le recrutement des co-activateurs de la transcription pour induire l'expression de ses gènes cibles (Cf. partie 1, paragraphe I.3.b).

Ainsi, notch inhibe la prolifération des CE par la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et l'apoptose. C'est pourquoi, dans l'endothélium en quiescence, les CE ne prolifèrent pas.
Notch a également un rôle dans l'activité de VEGFR. Il régule indirectement les voies de signalisation des MAPK et de PI3K/Akt en inhibant l'activité de VEGFR-1 et de VEGFR-2. Ce mécanisme permet d'expliquer l'état de prolifération actif retrouvé dans les cellules « stalk » contrairement aux cellules « tip » (102).

III.3. Stabilisation et maturation du néovaisseau :

III.3.a. Inhibition des signaux pro-angiogéniques :

La dégradation de la membrane basale par les MMP a non seulement généré des facteurs pro-angiogéniques mais également des facteurs anti-angiogéniques. De même, la composition de la matrice change et les interactions avec les intégrines s'en trouvent modifiées.
La dégradation de la matrice ne dure pas longtemps. L'expression de MT1-MMP est transitoire dans les cellules « tip » et l'activité de cette enzyme est régulée négativement lors de la phase de stabilisation et de maturation du vaisseau nouvellement formé (103). Les cellules murales secrètent des inhibiteurs des MMP (comme TIMP ou PAI-1) permettant de supprimer l'activité protéolytique de MT1-MMP des CE et empêchant la dégradation de la membrane basale.

Tous ces événements concourent à limiter l'angiogenèse et autorisent la phase de maturation des vaisseaux. Lorsque les vaisseaux se rejoignent, les cellules « tip » s'anastomosent et forment une boucle vasculaire et un réseau. Le nouveau tube est ainsi formé. Seulement ce tube n'est pas fonctionnel et nécessite une étape de maturation faisant intervenir plusieurs molécules impliquées dans les interactions cellulaires et matricielles (Cf. tableau 4) mais également différentes voies de signalisation (Cf. tableau 5) ; mais les mécanismes sont encore mal connus.

Table 2 Molecules governing cell-cell interactions

Molecules (cell type)	Putative roles
VE-cadherin (EC)	Forms EC–EC junctions
N-cadherin (EC, mural cell)	Facilitates EC junctions–mural cell communication
Connexins (EC, mural cell)	Facilitates EC junctions–EC junctions and EC junctions–mural cell communications
Occludins, claudins, zona occludins (ZO1, 2, 3) (EC)	Form tight junctions in brain and retinal capillaries
CD148 (EC)	Regulates EC–mural cell interaction

Table 3 Molecules governing cell-matrix interactions

Molecules (cell type)	Putative roles
$\alpha_5\beta_1$, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ (EC)	Suppress endothelial cell apoptosis[a]
Proteases (EC, mural cell)	Provide cues for vascular patterning by releasing growth factors Cleave matrix molecules (such as collagen XVIII to endostatin), plasma proteins (such as plasminogen to angiostatin) and protease molecules (such as MMP2 to PEX); cleaved products cause EC apoptosis
Protease inhibitors	Stabilize vessels by preventing dissolution of matrix

[a]Genetic approach does not support this role for $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ (ref. 25).

Tableau 4 : Les différentes molécules impliquées dans la maturation des vaisseaux et intervenant dans les interactions cellule-cellule (à gauche) ou cellule-matrice (à droite). *(Extrait de Jain, Nature Medecine, 2003) (104).*

Table 1 Signaling pathways

Ligand/receptor (cell type)	Putative roles
VEGF/VEGFR1, 2 (EC)	Upregulates proteases for matrix organization Generates provisional matrix by increasing permeability Upregulates PDGF-β to recruit mural cells to stabilize vessels Suppresses apoptosis to stabilize vessels Induces EC specialization (such as VVOs and fenestration)
$VEGF_{164}$/VEGFR2 and NRP1 (EC)	Promotes arterial growth (?)
VEGFC/VEGFR3 and NRP2	Guides lymphatic development
EG-VEGF/PKR1, 2 (EC)	Induces EC specialization in endocrine organs (such as fenestration)
Notch pathway (EC, mural cell)	Determines fate of the common progenitor cell (EC versus mural cell?) Establishes vessel fate (artery versus vein, upstream of ephrin signaling (in zebrafish?)
EphrinB2/EphB4 (EC)	Determines arterial and venous endothelial cell specialization Guides vessel branching
PDGFB/PDGFR-β (EC, mural cell)	Promotes proliferation, migration and recruitment of mural cells
S1P1/EDG1 (EC, mural cell)	Promotes recruitment of mural cells (downstream of PDGFB signaling?)
Ang1/Tie2 (EC)	Stabilizes vessels by facilitating interaction (EC–mural cell and EC–matrix) Suppresses apoptosis of ECs Induces hierarchical arrangement of vascular branching in the absence of mural cells
Ang2/Tie2 (EC)	Induces apoptosis of ECs in the absence of VEGF Determines lymphatic patterning
Ang1/Tie1, 2 (EC)	Coordinates vascular polarity
TGF-β1/TGF-βRII (EC, mural cell)	Promotes the production of ECM and proteases Promotes differentiation of fibroblast to myofibroblast to mural cell (through serum response factor)
TGF-β1/ALK1 (EC)	Regulates EC proliferation and migration (activation phase)
TGF-β1/ALK5 (EC)	Regulates vessel maturation (resolution phase)
TGF-β1/ALK1 and endoglin (EC)	Promotes arterio-venous specialization (through Notch/ephrin signaling?)
Syk/SLP76 pathway	Separates lymphatic from blood vessels

Tableau 5 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans la maturation des vaisseaux. *(Extrait de Jain, Nature Medecine, 2003) (104).*

III.3.a.1. Stabilisation et maturation de la paroi vasculaire :

La maturation de la paroi permet l'ajout des différents composants du vaisseau : le recouvrement par les péricytes, le dépôt de la MB et des différentes lames élastiques, la spécialisation des CE en fonction du tissu ou de l'organe (les jonctions cellule-cellule et cellule-matrice, les fenestrations, les récepteurs, la différentiation artério-veineuse…) (Cf. figure 34).

Formation de la lumière :

Au fur et à mesure que le bourgeon avance, les cellules « stalk » prolifèrent, s'allongent, établissent les jonctions cellule-cellule et forment la lumière du vaisseau. Plusieurs mécanismes de tubulogenèse (formation de la lumière du vaisseau) ont été décrits comme la réorganisation des contacts jonctionnels au niveau des contacts cellule-cellule, la formation et la fusion de vacuoles ou l'accumulation d'acide sialique générant des forces électrostatiques répulsives (Cf. bibliographie partie 2, paragraphe I-2). La VE-Cadhérine est impliquée dans ce mécanisme puisqu'elle est nécessaire pour permettre la localisation de la sialomucine (acide sialique, CD34) au niveau des contacts cellule/cellule et pouvoir ainsi former la lumière vasculaire (105).

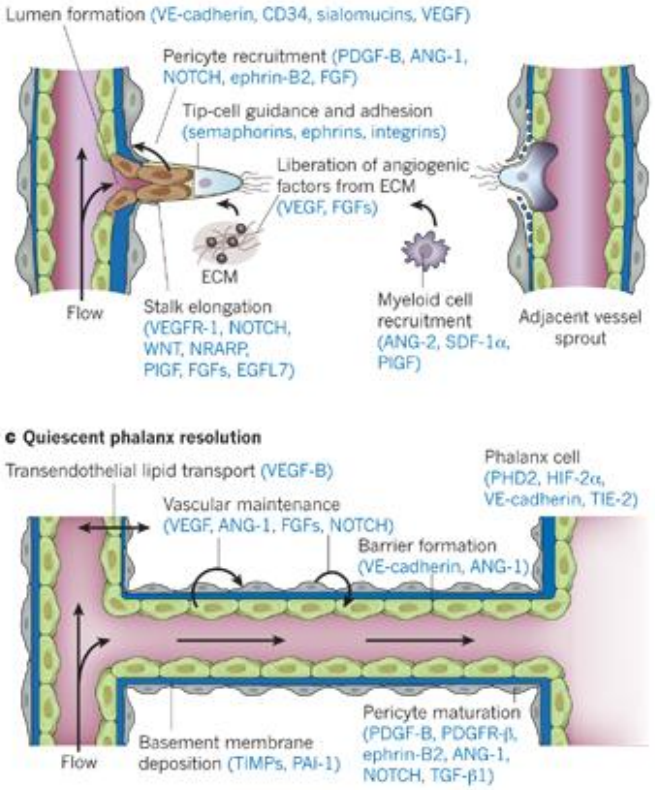


Figure 34 : Représentation des phases de résolution de l'angiogenèse. *(Extrait de Carmeliet 2011 Nature) (105).*

Recouvrement des péricytes :

La VE-Cadhérine est impliquée dans la stabilisation des vaisseaux en inhibant le signal du VEGFR-2 et en activant la voie de signalisation du TGF-β nécessaire pour la différenciation des cellules mésenchymateuses en péricytes. De plus, la signalisation induite par Notch dans les cellules « stalk » conduit non seulement à la régulation négative de VEGFR-2 et à l'augmentation de VEGFR-1 inhibant ainsi l'effet du VEGF sur ces cellules mais également à

l'augmentation de PDGFR-β dans les cellules murales exprimant Notch. Les CE libèrent également du PDGF-B qui va permettre la migration par chimiotactisme des péricytes exprimant le récepteur PDGFR.

Mise en place de la lame basale et activation de la quiescence :

Les CE et les péricytes activés secrètent les éléments nécessaires à la mise en place de la lame basale (106) et à l'inhibition de la prolifération des CE. Les péricytes vont également libérer de l'Ang-1 qui va pouvoir induire une re-localisation de Tie-1 au niveau des contacts jonctionnels des cellules jointives et activer la survie des CE en stimulant la voie de signalisation d'Akt, inhibant l'apotose. L'état de quiescence est activé.

Mise en place des jonctions cellulaires :

Les CE établissent des jonctions de type adhérentes et serrées par l'expression de VE-cadhérine, d'occludine et autres claudines. Ces jonctions permettent aux vaisseaux sanguins d'être résistants aux forces mécaniques et créent ainsi une barrière imperméable (107). Cette barrière est maintenue par différents récepteurs endothéliaux dont Tie-2, Notch et Robo. Ceux-ci sont impliqués dans la régulation de la phosphorylation des VE-cadhérine et permettent d'inhiber les effets du VEGF en inhibant la phosphorylation de VEGFR-2 par la protéine kinase SRC (Cf. figure 35).

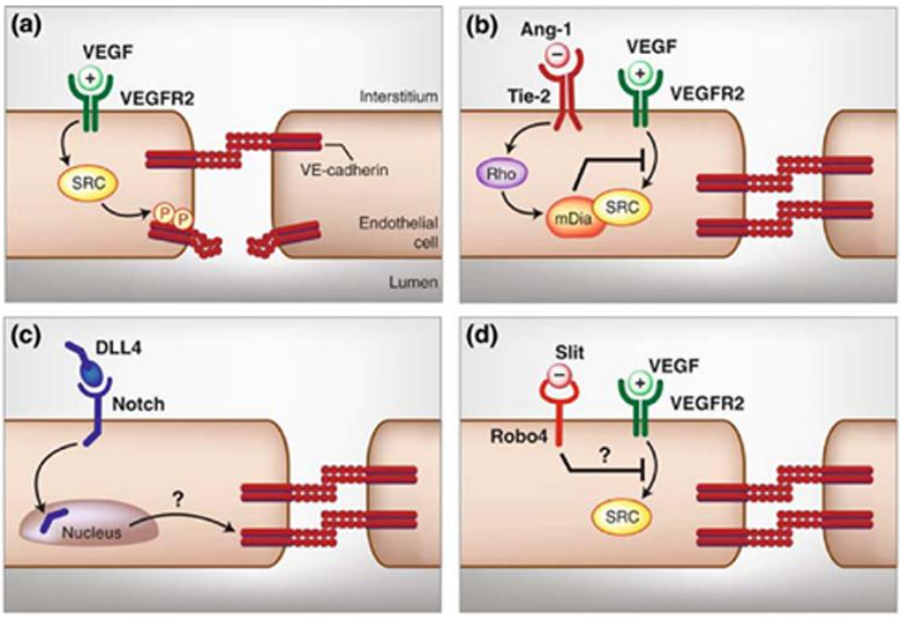


Figure 35 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans le maintien de l'intégrité vasculaire. *(Extrait de London, Angiogenesis,2009) (108).*

La diminution de la phosphorylation de VEGFR-2 s'accompagne d'une inhibition de l'activation de la voie des MAP kinases conduisant à une diminution de la prolifération cellulaire et d'une activation de la voie des PI3K par le VEGFR-2 conduisant à la survie. Les signaux anti-apoptotiques restent actifs et explique en partie l'inhibition de contact observée quand les cadhérines sont engagées dans des jonctions.

III.3.b. Remodelage et perméation du nouveau réseau capillaire :

Cette étape permet d'optimiser le réseau vasculaire en régulant le nombre de branchement par expansion ou élagage afin de le rendre fonctionnel et pouvoir répondre à la demande en nutriment et en gaz du tissu sous-jacent.
Les différentes isoformes du VEGF jouent un rôle dans le diamètre des vaisseaux : VEGF121 et VEGF165 augmentent le diamètre de la lumière alors que le VEGF189 conduit à des vaisseaux plus petits.
La régression de branches en trop (appelé pruning) est régulée par des forces hémodynamiques et des interactions entre les CE, péricytes et l'environnement tissulaire (42, 104, 109). Elle implique le désassemblage des jonctions, la rétractation et dans une certaine mesure l'apoptose des cellules (110-111).

La différentiation artério-veineuse implique différentes voies de signalisation dont celles de Notch, de VEGFR-2 et d'EphrinB2/EphB4. Cette étape permet d'équilibrer le nombre et l'assemblage correct des CE artérielles et veineuses dans les structures vasculaires distinctes ayant un diamètre adéquat (112). Comme pour la sélection des cellules « tip », le phénotype artériel est acquis par la signalisation de Notch (EphrinB2) alors que le phénotype veineux semble pris par défaut (90).

La fusion des cellules « tip » permet d'obtenir une lumière continue dans les nouveaux vaisseaux, le flux est ainsi établi (113). L'oxygénation des tissus régule négativement la production de VEGF permettant le retour des cellules à l'état de quiescence (90). Ce phénotype est assimilé à celui des cellules « phalanx», état pour lequel les cellules sentent et régulent la perfusion tissulaire (Mazzone et al 2009). L'angiogenèse physiologique s'arrête donc ainsi.

III.4. Structure des nouveaux capillaires

La mise en place de la lame basale permet la création d'une barrière à perméabilité réduite qui peut-être modulable entre le sang et les tissus environnants. En effet, en fonction des besoins du tissu à irriguer, on distingue différents types de capillaires (Cf. figure 36) :

- les capillaires continus : ils sont formés d'un endothélium et d'une lame basale ininterrompue permettant une perméabilité de base.

- les capillaires fenêtrés : les cellules endothéliales possèdent des pores qui rendent ces vaisseaux plus perméables.

- les capillaires discontinus : ce sont des capillaires fenêtrés dont la lame basale est discontinue. Cela forme des réseaux irréguliers et très perméables.

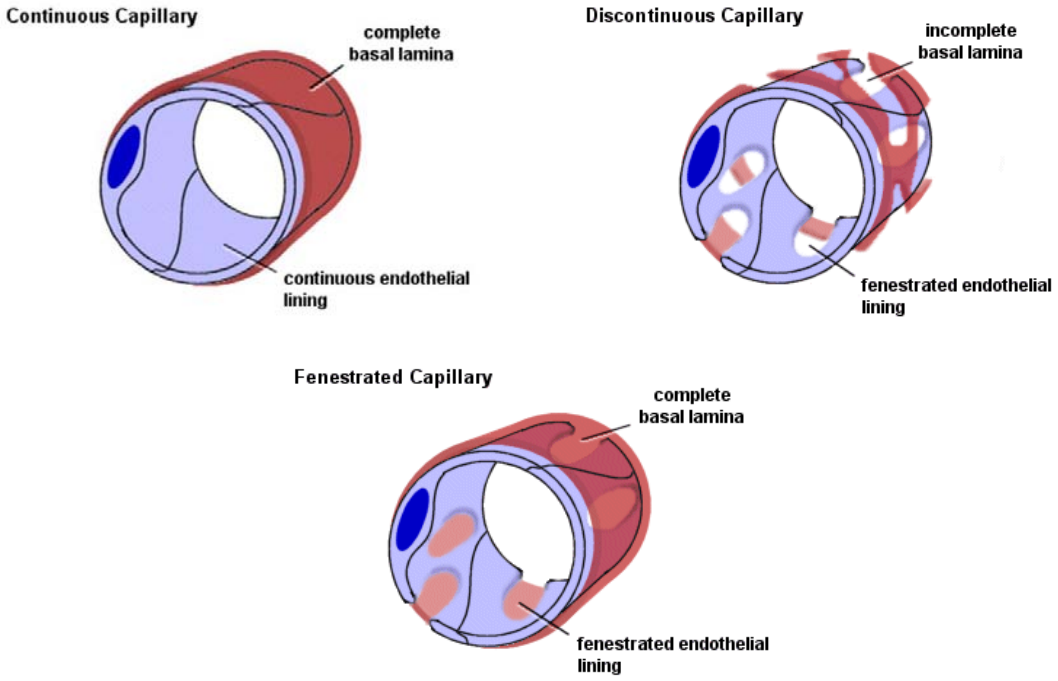


Figure 36 : Les différents types de capillaires. *(Extrait de http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Vascular/Vascular.htm).*

PARTIE 3 :

L'angiogenèse tumorale

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la formation de nouveaux vaisseaux a lieu lors des phases de développement normal d'un individu et est finement régulée : on parle d'angiogenèse physiologique. Mais ce processus peut également être déclenché lors du développement de certaines maladies comme le cancer. Dans ce cas, on parle d'angiogenèse tumorale.

I. Introduction

I.1. Le développement des tumeurs

Les tumeurs sont issues de la division clonale d'une cellule initiatrice cancéreuse ayant acquis certaines caractéristiques au cours de sa transformation et lui permettant de se diviser à l'infini (Cf. figure 37) :

- elles ont une capacité de croissance exagérée due à l'expression de protéines permettant de poursuivre le cycle cellulaire et également des protéines les rendant insensibles aux signaux d'inhibition de prolifération (inhibiteurs physiologiques, traitements),
- elles ont une indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération grâce à la production autocrine de facteurs de croissance et au changement de propriété de leur membrane plasmique par expression de différents récepteurs de facteurs de croissance (VEGFR, EGFR, PDGFR…),
- elles deviennent immortelles par inactivation de protéines de contrôle telles que p53 et pRb afin d'échapper à la mort cellulaire programmée ou apoptose,
- elles échappent à la sénescence par des mécanismes d'élimination du phénotype d'érosion télomérique par activation des télomérases qui protègent l'extrémité des chromosomes et permet ainsi une division illimitée des cellules,
- elles sont instables du point de vue génomique et chromosomique. La morphologie du noyau est altérée: anomalie de la taille du noyau avec une augmentation du rapport nucléoplasmique, anomalie de la forme du noyau, anomalie de nombre (bi ou multi-nuclée),
- elles sont capables d'envahir les différents tissus de l'organisme et former des métastases en modulant l'expression et l'activité des intégrines et la sécrétion de MMP permettant la dégradation de la lame basale de la tumeur,

- elles continuent de se diviser et s'empilent au lieu d'arrêter leur multiplication quand elles sont en contact les unes avec les autres (formation de foyers), propriété à l'origine de la perte de l'inhibition de contact et de la nécessité de l'ancrage,
- elles développent des stratégies pour échapper au système de surveillance immunitaire de l'hôte par inhibition des cellules présentatrices de l'antigène induit par le VEGF,
- elles sont capables d'induire l'angiogenèse tumorale nécessaire pour leur croissance par la libération de facteurs pro-angiogénique (VEGF, FGF-2, MMP…).

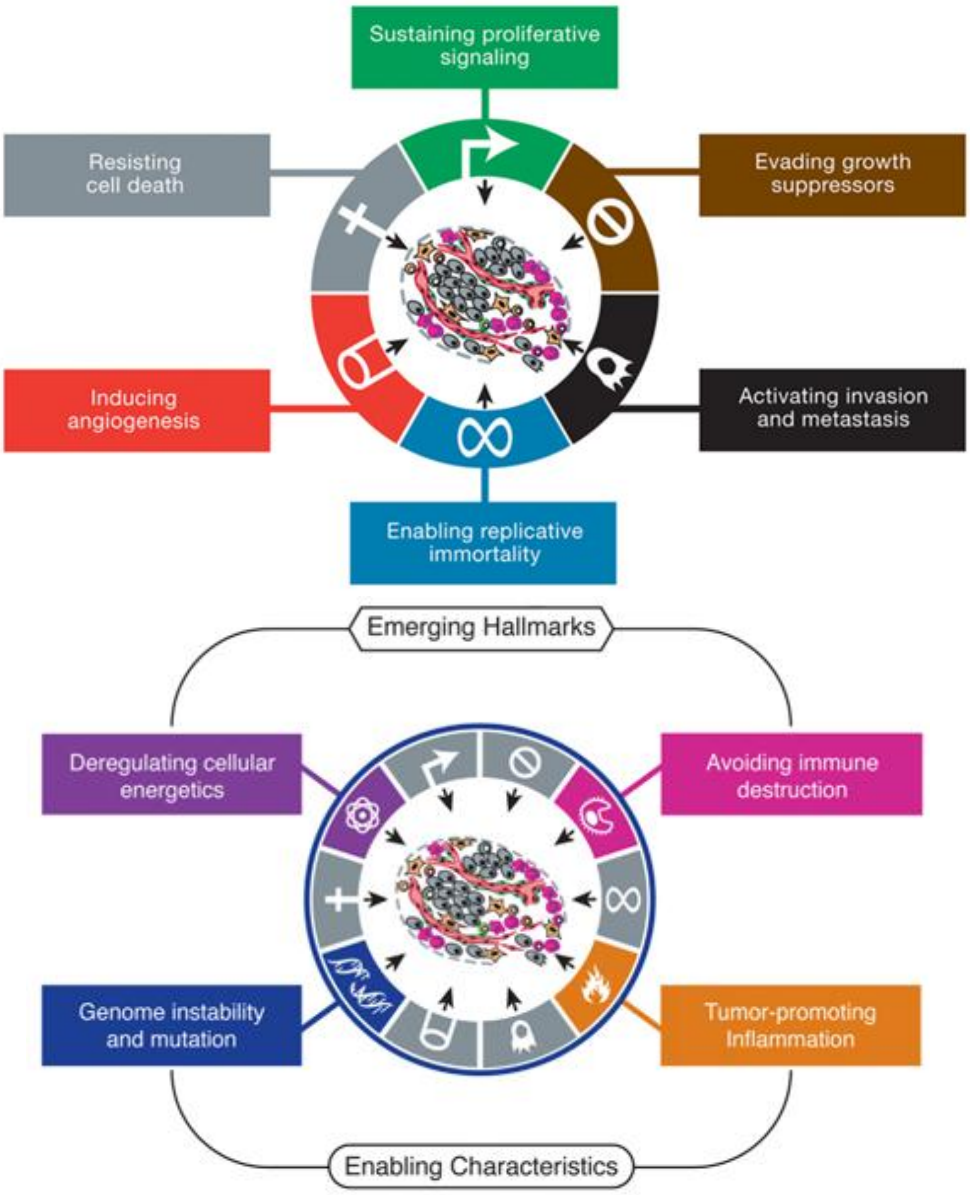


Figure 37 : Les caractéristiques du cancer. *(Extrait de Hanahan, Cell, 2011) (114).*

La transformation des cellules peut être obtenue par différents types de mutations touchant les proto-oncogènes et conduisant à un gain de fonction ou touchant les gènes suppresseurs de tumeur et conduisant à une perte de fonction du gène en question :

- altération génique : mutation ponctuelle non-sens ou faux-sens, mutation de substitution, déméthylation dans la séquence promotrice ou permettant de moduler la stabilité de la protéine,

- amplification génique permettant une augmentation du nombre de copie du gène et conduit donc à une surexpression de la protéine,

- translocation permettant l'échange de deux segments chromosomiques. Elle peut conduire à l'augmentation de l'expression du gène (translocation quantitative) ou à la synthèse de protéines aberrantes (protéine de fusion) (translocation qualitative),

- apport de matériel génétique exogène d'origine virale,

- phénomène épigénétique, c'est-à-dire intervenant dans les voies de régulation de l'activité des oncogènes (épigénétique : qui ne modifie pas la structure du gène, contrairement aux mutations, mais modifie son expression).

Une seule mutation ne suffit pas pour conduire à un cancer. La transformation est multifactorielle et s'effectue en plusieurs étapes : c'est la phase de promotion. Elle permet à la cellule initiée d'aller jusqu'au cancer histologiquement décelable (cancer in situ). La combinaison des altérations génétiques peut donner lieu à une signature moléculaire de certains cancers sur laquelle les cliniciens s'appuient pour poser leur diagnostic.

Au début, les cellules sont peu nombreuses, la croissance est lente et elles manquent de facteurs de croissance. A fur et à mesure que les mutations s'installent, la croissance devient plus rapide et la perte cellulaire est faible. Ainsi, le volume de la masse tumorale s'accroit, les déchets s'accumulent et l'oxygène se fait de plus en plus rare. La mort cellulaire devient de plus en plus élevée et il apparaît des zones de nécrose : c'est la phase de ralentissement. Dans cette phase, la tumeur a atteint un état d'équilibre dans lequel le nombre de cellules en prolifération contrebalance le nombre de cellules mourantes. Cette tumeur peut rester en dormance et être non détectable pendant des années tant qu'elle reste dans cette phase avasculaire. Seulement parfois la tumeur arrive à déclencher la formation de nouveaux vaisseaux ou angiogenèse tumorale. Cette phase dite vasculaire permet d'apporter à la tumeur les éléments nécessaires à sa croissance.

I.2. Cas des cancers des VADS

I.2.a. Généralités

Les cancers des voies aéro-digestives supérieures (VADS) représentaient en 2008 la septième cause de décès par cancer dans le monde (115). En termes d'incidence, la France se place tristement en tête des pays pour ce type de cancer, qui cause 2,7% de l'ensemble des décès par cancer (données recueillies en 2005, rapportée par l'Institut National du Cancer dans « La situation du Cancer en France en 2009 »).

Ces cancers incluent des tumeurs malignes survenant à différents sites anatomiques dont le plus fréquent est la cavité buccale (44% des tumeurs des VADS), suivie de l'oropharynx, de l'hypopharynx et du larynx (Cf. figure 38). Le type histologique épidermoïde représente 90% des carcinomes des VADS (116).

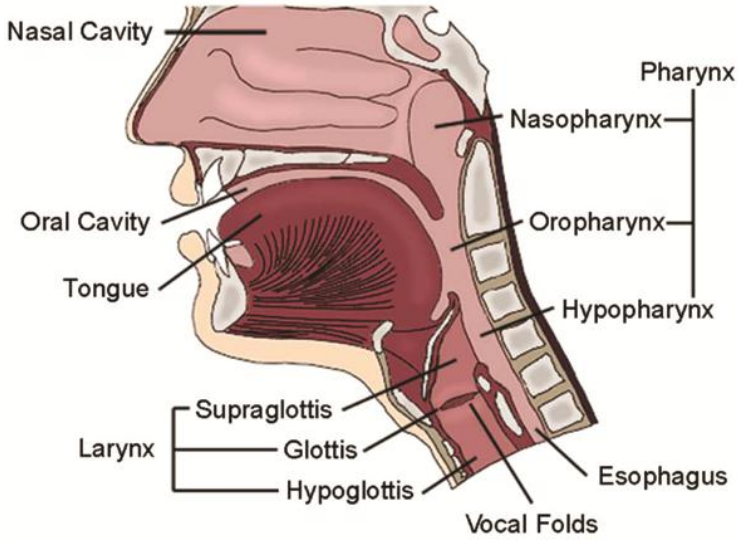


Figure 38 : Représentation des voies aérodigestives supérieures (VADS) *(Extrait de Lieber, Head and neck, 2010) (117).*

De par leur localisation, les tumeurs des VADS surviennent après inhalation ou ingestion de divers produits qui agissent localement et directement sur les cellules épithéliales. Ainsi, les principaux facteurs de risque sont la consommation d'alcool (éthanol, esters de phorbols,…), de tabac (nitrosamines, benzopyrènes,…). Un autre facteur de risque moins connu est l'infection par le virus du papillome humain (ou HPV) et provient du potentiel de transformation et de promotion de la croissance cellulaire que confère le virus.

La carcinogenèse des cancers des VADS est un processus réalisé en plusieurs étapes (Cf. figure 39). Tout d'abord, les cellules épithéliales deviennent hyperplasiques, elles prolifèrent mais l'épithélium reste inchangé, il n'y a pas de création de nouveaux tissus. Puis, lors de la dysplasie, les cellules commencent à se désorganiser, le développement du tissu est perturbé. Enfin, le carcinome est la dernière étape des cancers de l'épithélium et peut rester localisé ou devenir invasif et former des métastases.

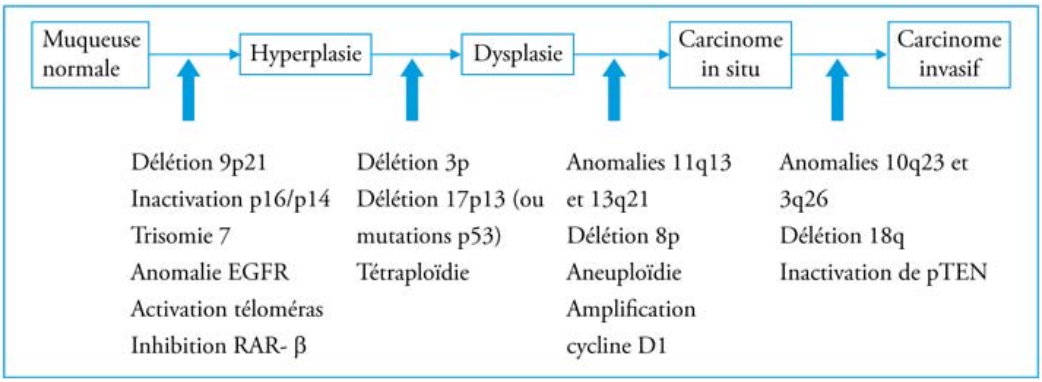


Figure 39 : Les différentes étapes du développement des cancers des VADS. *(Extrait de Fayette, Bull Cancer, 2009) (118).*

Ce type de cancer est difficile à traiter en raison de leur localisation et de leur forte tendance à envahir les tissus environnants et à se disséminer dans les nodules lymphatiques. De plus, l'évolution de la maladie est difficile à prédire avec les outils conventionnels (clinique, histopathologie). C'est pourquoi, la recherche de biomarqueur est nécessaire pour prédire l'évolution de la maladie mais également pour faire profiter les patients d'une thérapie plus adaptée. De nombreuses études ont été réalisées et ont conduit à l'identification de plusieurs molécules impliquées dans cette pathologie dont le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (Cf. tableau 6).

Molecular biomarker	Prognostic significance	Sample size and *P* value variation (min.-max.)[a]	No prognostic significance	Sample size and *P* value variation (min.-max.)[a]	Total
Cell cycle acceleration and proliferation					
EGFR	5[b]	41–140 – 0.0002–0.02	2	47–165 – 0.114	7
Cyclin D1	2[b,c]	140–348 – <0.0001–0.0181	–	–	2
Ki-67	3	41–113 – 0.0001–<0.001	1	74 – 0.091	4
PCNA	–	–	3	60 – 113 – >0.05	3
Akt1	1	84 – 0.013	–	–	1
Tumour suppression and apoptosis					
p53 and p63	9[b]	45–140 – 0.0002–0.049	–	–	9
p21 and p27	2	106–192 – 0.018–0.03	1	192 – 0.43	3
Bcl-2 family members	4	35–110 – <0.005–0.0489	1	110 – 0.4901–0.8287	5
pRb	2	220–348 – 0.004–<0.05	–	–	2
Survivin	1	78 – 0.002	–	–	1
Hypoxia					
HIF-1α	3	57–112 – 0.004–0.048	–	–	3
CA IX	2	60–117 – 0.02–<0.05	1	68 – 0.062	3
GLUT-1	1	40 – 0.035	–	–	1
EPOR	1	43 – 0.030	–	–	1
Angiogenesis					
VEGF	4	59–1002 – <0.001–0.045	1	84 – 0.168	5
CD105	3	26–176 – <0.001–0.02	–	–	3
Ephs	1	59 – 0.037	–	–	1
Cell adhesion and matrix degradation					
MMPs	6	68–138 – 0.008–0.032	1	38 – data not shown	7
CD44	3	36–138 – 0.01–0.03	–	–	3
Cadherins	3	47–67 – <0.0001–<0.05	1	84 – data not shown	4
Catenins	1	135 – 0.0088	–	–	1
Versican	1	139 – 0.048	–	–	1
Total	58		12		70

[a] Variations regarding the number of investigated patients and concerning the *P* statistical value (Cox regression or Kaplan–Meier analysis) according to each specific marker studied amongst the different publications.
[b] Combined expression of EGFR, p53, and cyclin D1 was associated with an unfavourable prognosis in OSCC patients[72].
[c] Tumours with downregulation of p16 and overexpression of cyclin D1 exhibited the worst prognosis[28].

Tableau 6 : Valeurs pronostiques de différents biomarqueurs des cancers des VADS identifiés par immunohistochimie *(Extrait de Oliveira, Int. J. Oral Maxillofac. Surg, 2011) (119).*

I.3. Le récepteur EGFR :

La voie de signalisation d'EGFR est activée de manière aberrante dans de nombreux types de cancers dont les cancers des VADS et est souvent associée à un mauvais pronostic et une survie diminuée. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'activation de cette voie dont l'augmentation du nombre de récepteur présent à la surface cellulaire ou des délétions du domaine extracellulaire conduisant à un variant activé en permanence indépendamment de la liaison du ligand (variant III ou EGFRvIII). Des mutations dans le domaine tyrosine kinase ou des mutations dans les protéines effectrices peuvent également conduire à une augmentation de la fonctionnalité de cette voie de signalisation.

I.3.a. La voie de signalisation d'EGFR :

EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase appartenant à la famille ErbB/HER comprenant 4 membres et possède de nombreux ligands (Cf. figure 40).

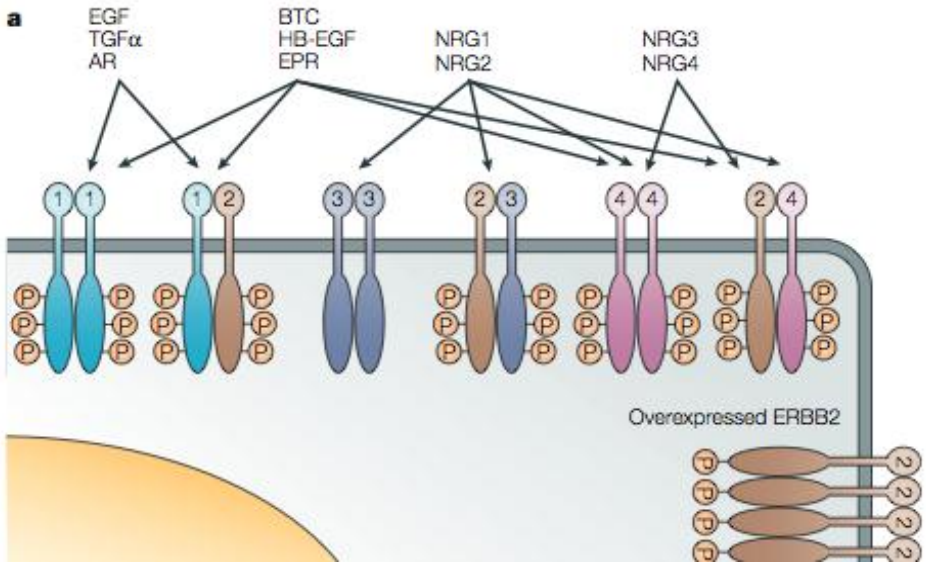


Figure 40 : Les récepteurs de la famille HER et leurs ligands. *(Extrait de Hynes, Nature reviews cancer, 2005) (120).* AR : amphiréguline, BTC : bétacelluline, EGF : epidermal growth factor, HB-EGF : heparin-binding EGF, EPR : épiréguline, NRG : neurégulines.

Comme pour tous les récepteurs à activité tyrosine kinase, la liaison du ligand conduit à un changement de conformation permettant l'homo- ou l'hétéro-dimérisation du récepteur suivi d'une auto-activation des résidus tyrosines dans le domaine intracellulaire du récepteur (Cf. figure 41).

Selon les molécules effectrices recrutées, différentes protéines de signalisation (encore appellées protéines effectrices) sont activées dont la voie des MAPK kinases et de PI3K/AKT conduisant à l'augmentation de la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. EGFR est également impliqué dans la mobilité des cellules par l'intermédiaire de RAC et des FAK (focal adhesion kinase) et joue donc un rôle dans l'adhésion et la formation de métastases. La voie de PI3K est induite à des niveaux variables selon les co-récepteurs recrutés lors de la dimérisation et permet la modulation du signal.

L'activation en chaîne de cette cascade conduit à l'activation de facteurs de transcription tels que c-fos, c-jun, c-myc ou STAT (signal transducer and activator of transcription). Ceux-ci rentrent dans le noyau de la cellule et induisent la transcription de gènes cibles entrainant une augmentation de la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (121).

Le lien entre EGFR et l'angiogenèse a été montré dans un modèle de souris transgéniques : lorsque le récepteur EGFR a été inactivé par mutation, l'angiogenèse était diminuée mais celle-ci a pu être restaurée par injection de VEGF (122-123). Ce lien a également été montré

par l'utilisation d'inhibiteurs d'EGFR comme le gefitinib ou le cetuximab. Ces agents induisent une diminution de la libération des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, IL-8, FGF-2 ou le TGF-α par les cellules tumorales (124-125). Des études cliniques ont montré une corrélation entre la sur-expression d'EGFR et la radiorésistance (126) et l'utilisation d'inhibiteurs a permis de restaurer une certaine radiosensibilité (127). Ceci peut-être du à un mécanisme de normalisation des vaisseaux tumoraux qui permettrait un meilleur accès aux agents cytotoxiques au niveau de la tumeur (128). Enfin, quelques études suggèrent qu'EGFR aurait un lien direct avec l'angiogenèse (127, 129), vraisemblablement à cause de l'expression de ce récepteur à la surface des cellules endothéliales composant la paroi des vaisseaux tumoraux (130).

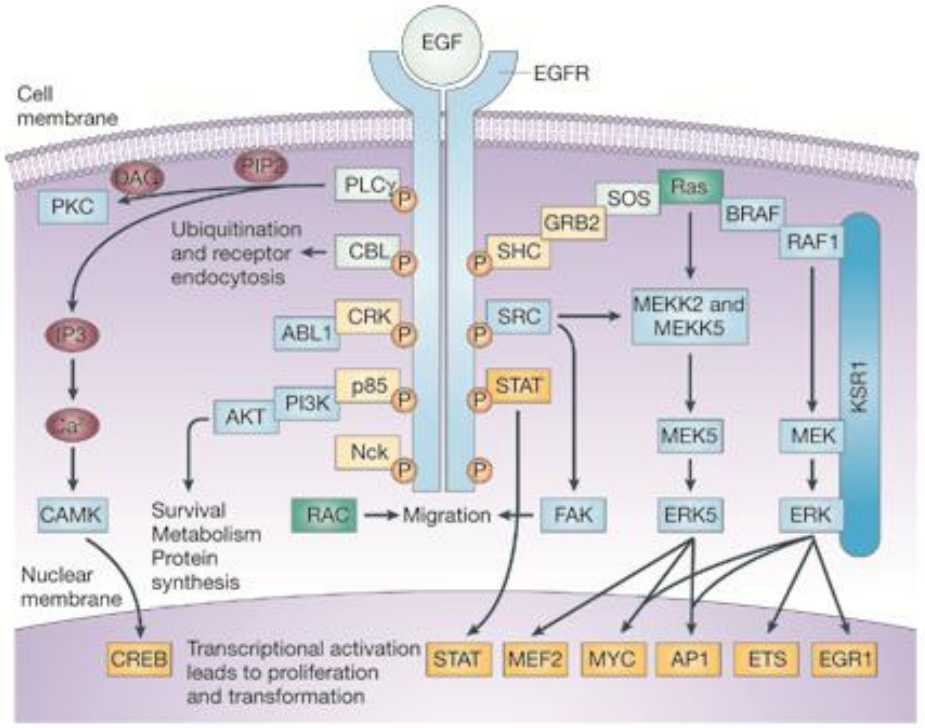


Figure 41 : Représentation de la voie de signalisation d'EGFR *(Extrait d'Allison, Nat. Rev. Cancer, 2010) (131).*

I.3.b. L'internalisation du complexe EGFR-ligand :

La partie intracellulaire du récepteur EGFR peut être ubiquitinylée par l'enzyme ubiquitine ligase E3 (cbl) et permettre ainsi la formation de vésicules d'endocytoses par un mécanisme dépendant de la clathrine. Cette internalisation permet de diriger le récepteur vers le compartiment lysosomial où il sera détruit ou encore le diriger vers la membrane plasmique

où il pourra être de nouveau activé (Cf. figure 41). Des enzymes sont capables d'enlever l'ubiquitinylation et ainsi participent à la régulation de ces mouvements.

Les mécanismes impliqués dans l'internalisation d'EGFR ne sont pas clairement établis. Des expériences de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que la liaison de Grb2 semble jouer un rôle important pour cette internalisation ; de même que la phosphorylation de certains résidus tyrosine ou sérine (Cf figure 42) (132). Un site de liaison pour le complexe AP-2 (clathrin adaptor protein complex 2) a également été trouvé dans la partie cytosolique d'EGFR mais il ne semble pas être essentiel pour l'internalisation de ce récepteur.

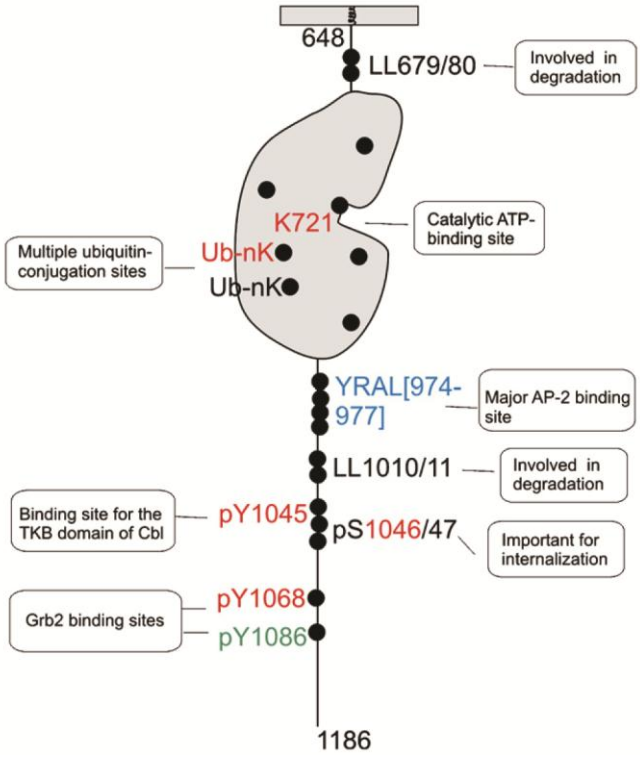


Figure 42 : Représentation des motifs impliqués dans l'endocytose du récepteur EGFR. *(Extrait de Sorkin, Exp Cell Res, 2009) (132).*

La présence du complexe EGF-EGFR a été retrouvée dans le noyau de certaines cellules. De plus en plus d'évidences indiquent qu'EGFR pourrait exercer un rôle de facteur de transcription. En effet, il a été montré que la fraction nucléaire d'EGFR possédait une activité d'ADN topoisomérase (133) et peut se lier à une séquence spécifique de l'ADN riche en AT (ATRS) et permettre la transcription du gène de la cycline D1, protéine impliquée dans régulation du cycle cellulaire et importante pour la progression en phase G1 (134). Ceci est en accord avec la corrélation trouvée entre la présence d'EGFR dans le noyau et l'état prolifératif du tissu (134) ou le faible pronostic et la résistance aux traitements (135). De plus, l'équipe de

Li et al. ont également suggéré que le domaine tyrosine kinase pourrait exercer un control négatif sur l'activation de la transcription puisque le domaine cytoplasmique entier d'EGFR montre une transactivation plus faible que la partie cytoplasmique C-term riche en proline (134). Le mécanisme du transport nucléaire d'EGFR n'est pas encore bien compris mais il a été montré récemment une implication de la dynamine et de la clathrine dans ce processus de translocation nucléaire (136).

I.4. Le facteur tissulaire (FT) :

Le facteur tissulaire (ou CD142) est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de cytokine de class II dont le rôle principal est d'activer la cascade de la coagulation. Le FT est exprimé constitutivement par les fibroblastes, les cellules musculaires lisses et les cellules épithéliales (c'est-à-dire les cellules extravasculaires) et n'est donc normalement pas en contact avec la circulation sanguine. Ainsi TF est séparé de son ligand, une protéase à sérine (le facteur FVII(a)), tant que l'intégrité vasculaire est préservée.

I.4.a. La cascade de coagulation :

La coagulation est un phénomène physiologique localisé au niveau d'une lésion vasculaire entraînant l'activation en chaîne de facteurs plasmatiques circulant sous forme de précurseurs inactifs (ou zymogènes) et aboutissant à la formation d'un thrombus plaquettaire et d'un réseau de fibrine (caillot fibrino-plaquettaire) afin de combler cette lésion et de limiter la perte sanguine (Cf figure 43).

Elle peut être initiée de 2 façons différentes :

- la voie principale (ou exogène ou extrinsèque) : exposition du sang au contact du facteur tissulaire (FT).

- la voie de contact (ou endogène ou intrinsèque) : exposition du sang au contact d'une surface chargée négativement, surface catalytique sur laquelle vont se fixer les facteurs de la coagulation.

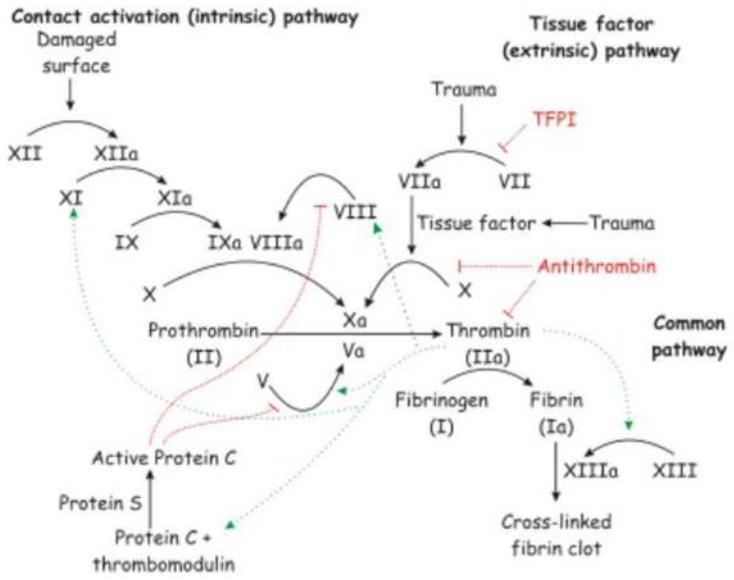


Figure 43 : La cascade de la coagulation. *(Extrait du site internet de la source encyclopédie Wikipedia)*

L'activation en chaîne des facteurs de la coagulation de ces 2 voies aboutit à la formation de thrombine, enzyme protéolytique qui va transformer le fibrinogène circulant en fibrine, constituant principal du caillot (Cf. figure 43).

Le FT fixe le facteur FVII circulant via son domaine extracellulaire et le complexe engendré active les facteurs X et le facteur IX ; ces interactions sont favorisées par la présence de phospholipides anioniques et de Ca^{2+}.

I.4.b. Rôle du TF dans le cancer :

Comme pour EGFR, le facteur tissulaire est sur-exprimé dans certains types de cancer dont les cancers des VADS (137) (138), expression qui semble être liée à la perte du gène suppresseur de tumeur p53 ou à l'activation d'oncogènes par les cellules tumorales lors de leur transformation (Cf figure 44).

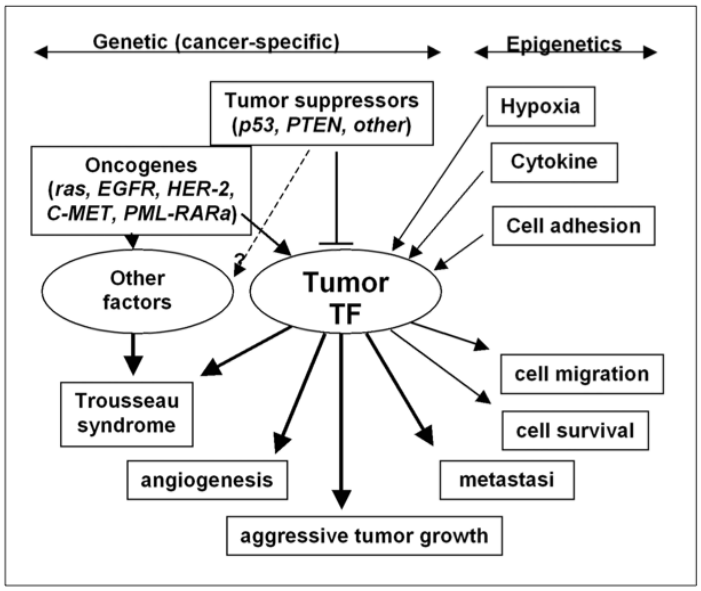


Figure 44 : les facteurs impliqués dans la sur-expression du facteur tissulaire et les conséquences sur le développement tumoral. *(Extrait de Rak et al., Semin Thromb Hemost, 2006)* (139)

Le facteur tissulaire est associé à différents processus du développement tumoral et son expression a été corrélée avec le grade histologique des cancers et associé à une dissémination tumorale et à l'angiogenèse (Cf figure X). Le domaine intracellulaire du TF est impliqué dans le processus de dissémination des cellules tumorales puisque sa délétion diminue de façon très nette le potentiel métastatique des cellules tumorales (140).

Par son rôle dans la coagulation sanguine, le FT est impliqué dans l'état d'hypercoagulabilité des patients atteints de cancers et est associé à une incidence plus élevée de complications thromboemboliques. Le TF est également présent au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral et son expression est probablement induite par les facteurs inflammatoires libérés par les cellules cancéreuses. Et, à cause de l'hyperperméabilité vasculaire observée dans les tumeurs, les facteurs de coagulation, normalement séquestrés dans le compartiment vasculaire, peuvent également diffuser à l'intérieur du stroma et initier le processus de coagulation (141).

Différentes études ont évoqué l'implication du facteur tissulaire dans l'angiogenèse. En effet, la délétion complète du gène TF chez la souris a conduit à des problèmes de remodelage des vaisseaux du sac vitellin et à un syndrome hémorragique conduisant à la mort des embryons vers le 9ième jour (142). De plus, une étude a montré que l'augmentation de l'expression du TF

dans les cellules tumorales était associé avec une augmentation de l'expression de VEGF, à une diminution de la thrombospondine et à une augmentation de la taille de la tumeur (143). Il a d'ailleurs été montré que la partie cytoplasmique de TF régule la production de VEGF et l'angiogenèse (144).

Le mécanisme d'induction de l'angiogenèse par le facteur tissulaire peut être réalisé de manière dépendante ou non de la coagulation (Cf figure 45).

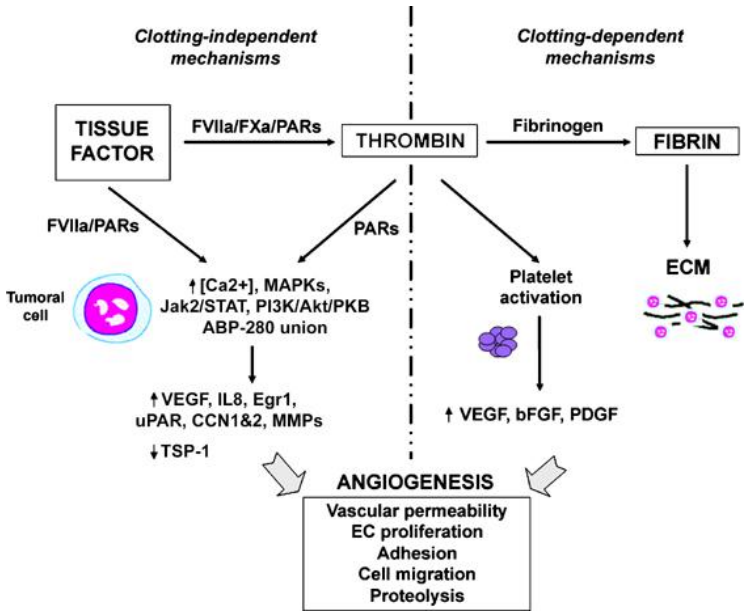


Figure 45 : Voie d'activation de l'angiogenèse tumorale par le facteur tissulaire. *(Extrait de López-Pedrera et al., Leukemia, 2006) (145).*

Des études suggèrent un rôle de récepteur pour le FT notamment à cause de la présence de résidus phosphorylables dans sa partie intracellulaire. En effet, la liaison du facteur FVIIa sur le domaine extracellulaire du FT induit la phosphorylation de 2 sérines par un mécanisme dépendant de la PKC (proteine C Kinase) (146).

De la même manière, l'extrémité C-terminale de la protéine liant l'actine ABP-280 (Actin Binding Protein 280) se fixe au domaine intracytoplasmique du FT alors que son extrémité N-terminale se lie aux filaments intracellulaires d'actine (147). Cela active la voie des MAP kinases à l'origine de la phosphorylation de plusieurs kinases focales favorisant alors l'adhésion et la migration cellulaire.

Seulement peu de données concernent l'activité du TF dans le cadre des cancers des VADS.

I.4.c. Le TF circulant :

Le TF circulant est généralement véhiculé par des petites particules microscopiques libérées par les cellules apoptotiques, les cellules activées mais également les cellules cancéreuses (148) (Cf. partie 4 : Les microvésicules paragraphe II.5). La libération de cette forme particulaire de TF est augmentée dans de nombreuses maladies dont le cancer et contribue à l'augmentation des incidents thrombotiques observés chez les patients. Mais cette libération est également augmentée sous l'effet des traitements comme la chimiothérapie et la radiothérapie.

Le TF existe également sous forme soluble et provient de l'épissage alternatif du gène (149). Ce variant nommé asTF (alternative spliced TF) ne possède pas de domaine transmembranaire ce qui réduit considérablement ses propriétés pro-coagulantes (150).

II. L'angiogenèse tumorale

II.1. Les vaisseaux tumoraux :

II.1.a. Caractéristiques :

La structure des vaisseaux tumoraux est très différente de celle des vaisseaux normaux. Le réseau vasculaire tumoral n'a pas de hiérarchie dans la structure des branchements (Cf. figure 46), il est irrégulier en forme, chaotique, déstructuré, anormal, tortueux et allongé (Cf. figure 47). Ce réseau est formé de vaisseaux de diamètre irrégulier dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération.

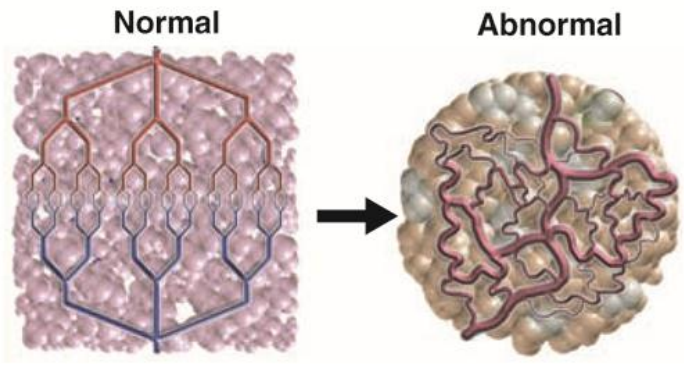


Figure 46 : Représentation de la hiérarchisation des vaisseaux normaux (à gauche) et tumoraux (à droite). *(Extrait de Jain, Science, 2005) (151).*

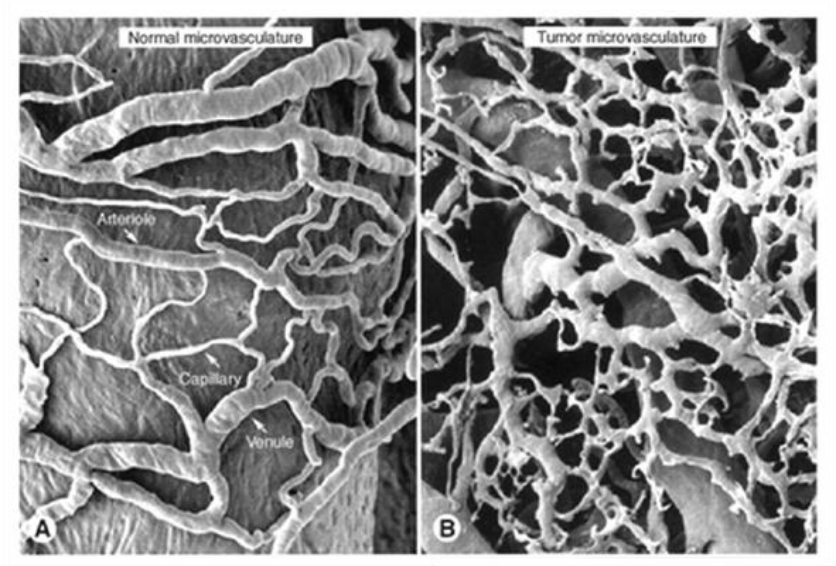


Figure 47 : Structure des vaisseaux tumoraux. *(Extrait de McDonald, Nature medecine, 2003) (152)*. Image obtenue par microscopie à balayage (SEM) d'un vaisseau normal (vasa vasorum de sinus carotidien de rat, gauche) et tumoral (xénogreffe de tumeur humaine chez la souris nude, droite).

Le réseau vasculaire tumoral est lâche et relativement perméable. C'est un réseau faiblement fonctionnel où le sens de circulation peut être perturbé et rend difficile la délivrance des médicaments chimiothérapeutiques au sein de la tumeur. De même, la délivrance inadéquate de l'oxygène dans les tissus tumoraux conduit à une certaine résistance vis-à-vis des traitements à base de radiothérapie. La plasmine, libérée par l'activation des urokinases induite par le VEGF, et les éléments non figurés du plasma diffusent et fournissent un terroir riche pour la prolifération des cellules tumorales (ou niche tumorale).

Les défauts structuraux des vaisseaux tumoraux impliquent de multiples anormalités fonctionnelles (recouvrement des péricytes anormal, trou dans l'endothélium, passage de cellules tumorales, exsudation de plasma dans la tumeur ce qui augmente la pression interstitielle tissulaire à l'intérieur de la tumeur, …). Ces anomalies touchent chaque constituant de la paroi des vaisseaux sanguins c'est-à-dire les CE, les péricytes et la MB (Cf. figure 48).

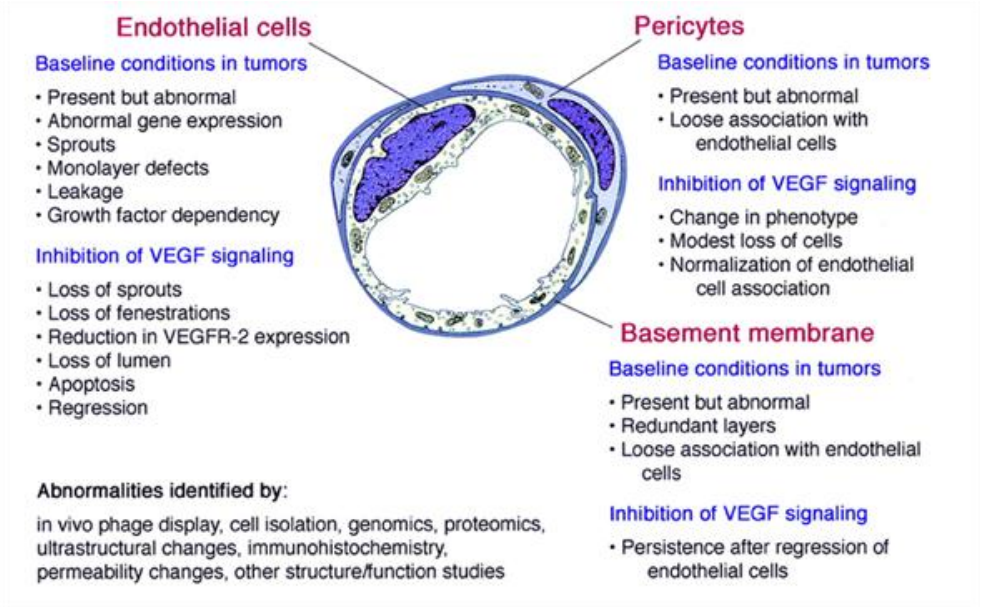


Figure 48 : Schéma représentant les anomalies de chaque composant des vaisseaux tumoraux. *(Extrait de McDonald, CHEST, 2005) (153).*

II.1.b. Les cellules endothéliales tumorales :

Les cellules endothéliales sont hétérogènes au sein de la tumeur : certaines sont actives, immatures et en prolifération alors que d'autres sont quiescentes ou même entrent dans des processus d'apoptose. Elles possèdent des anomalies génétiques (aneuploïdies, chromosomes multiples) qui ont peut-être une part de responsabilité dans la résistance aux thérapies anti-angiogéniques (154). Elles secrètent des protéines qui sont très peu ou pas libérées par les CE normales (comme certains facteurs de croissance, récepteurs de molécules d'adhésion, facteur protecteur de l'apoptose, métalloprotéases...).

Par ailleurs, les cellules endothéliales se développent anormalement en se superposant les unes sur les autres (155). La MB possède des couches supplémentaires et n'est pas liée aux cellules. Les jonctions entre les cellules endothéliales sont lâches ce qui augmente la perméabilité vasculaire bien que les vaisseaux ne soient pas fenêtrés. Ceci facilite la dissémination de cellules cancéreuses dans l'organisme mais le réseau lymphatique participe également à la formation des métastases.

II.1.c. Les péricytes tumoraux :

Contrairement aux péricytes des vaisseaux sanguins normaux qui s'accrochent solidement aux cellules endothéliales et sont enveloppés par une membrane basale bien ajustée, la plupart des

péricytes dans les vaisseaux tumoraux sont vaguement associés aux cellules endothéliales ce qui fragilise les vaisseaux tumoraux. (Cf. figure 49). Ils présentent également des anomalies dans l'expression de gènes tels que l'actine ce qui rend plus difficile le diagnostic. L'absence de ce marqueur peut ainsi être mal interprétée (absence de péricytes).

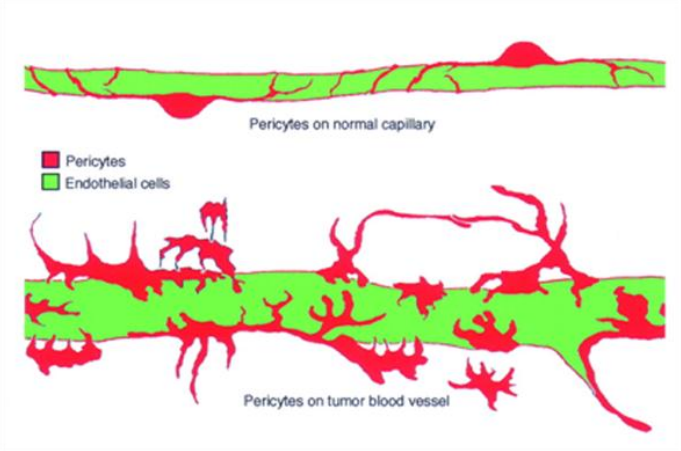


Figure 49 : Schéma représentant la répartition des péricytes au niveau des vaisseaux sanguins. *(Extrait de McDonald, CHEST, 2005) (153).*

En résumé, les vaisseaux tumoraux sont très différents des vaisseaux normaux de part leur structure et leurs propriétés (Cf. tableau 7). Ces différences morphologiques permettent aux vaisseaux tumoraux d'être plus réceptifs aux médicaments anti-vasculaires par exposition du récepteur VEGFR, récepteur masqué dans les vaisseaux normaux.

	Vaisseau normal	**Vaisseau tumoral**
Structure	Organisé, stable,	Désorganisé, instable
Localisation	localisé	Localisation inappropriée dans la tumeur
Perméabilité	Perméabilité contrôlée	Perméabilité accrue
Circulation	hiérarchisée	Shunt artério-veineux
Péricytes	Couverture optimale	Insuffisant. Mutation génétique
CE	Quiescentes	Anormales (mutation génétique) Dépendent des facteurs de survie VEGF
Flux	Contrôlé	Imprédictible (deux sens)
MB	Lie les CE et péricytes	Couches supplémentaires, liaison non apparente
Balance angiogénique	Contrôlée	Déséquilibrée

Tableau 7 : Récapitulatif de la différence entre les vaisseaux normaux et tumoraux. *(Adapté de Corvol, cours donnés au Collège de France en 2006, Paris, France).*

II.2. Les mécanismes de formation :

Les vaisseaux tumoraux peuvent être formés par plusieurs mécanismes (Cf. figure 50) :

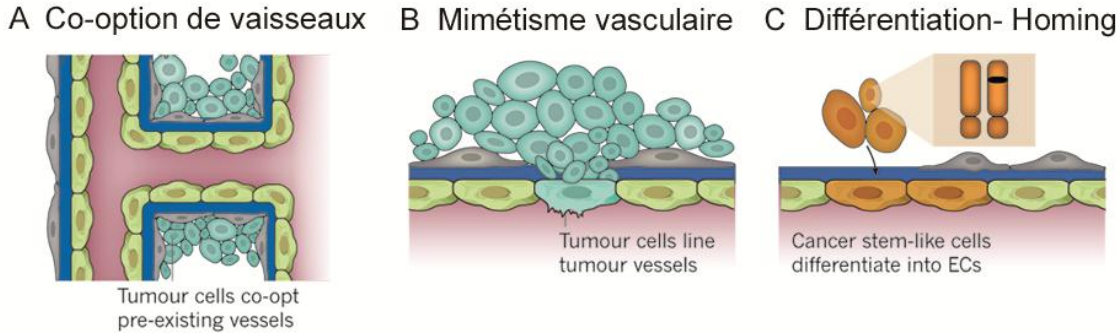


Figure 50 : Les différents mécanismes de formation des vaisseaux spécifiques de l'angiogenèse tumorale. *(Adapté de Carmeliet, Nature, 2011) (105).*

II.2.a. Le bourgeonnement capillaire :

Le mécanisme de formation classique de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement capillaire (ou sprouting) est présent au niveau de l'angiogenèse tumorale. La plupart des signaux pro-angiogéniques libérés par la tumeur stimulent sans relâche l'angiogenèse tout au long de la croissance tumorale. Le faible recouvrement des vaisseaux par les péricytes rend les récepteurs endothéliaux disponibles en permanence d'où un bourgeonnement continu. L'angiogenèse n'est plus contrôlée dans le temps et dans l'espace. De plus, l'étape de maturation n'a pas lieu, les vaisseaux formés sont donc anormaux.

II.2.b. La co-option de vaisseaux :

Dans ce modèle, la tumeur est capable de co-opter c'est-à-dire de récupérer des vaisseaux normaux à son profit en se les appropriant (Cf. figure 50 A).

Lors de la co-option des vaisseaux, les cellules tumorales se développent autour des vaisseaux existants. Rapidement, les vaisseaux commencent à produire de manière autocrine de l'Ang-2, protéine responsable de la déstabilisation des vaisseaux. Les cellules endothéliales des vaisseaux co-optés commencent à mourir par apoptose. La tumeur devient alors avasculaire et hypoxique. Sous l'action du VEGF induit par la tumeur, les vaisseaux cessent leur régression et l'angiogenèse par bourgeonnement est déclenchée. Ainsi, l'Ang-2 participe à la déstabilisation des vaisseaux en l'absence de VEGF et à l'angiogenèse après induction de l'expression de VEGF (4).

II.2.c. Le mimétisme vasculaire :

Les cellules tumorales peuvent également participer à la formation des vaisseaux tumoraux en s'incorporant dans l'endothélium vasculaire tumoral par mosaïsme ou mimétisme vasculaire (Cf. figure 50 B). Dans le cancer colorectal ; il a été trouvé environ 15 % de mosaïsme représentant 3 à 8% de la surface totale des vaisseaux (156). Ce mécanisme facilite l'accès des cellules tumorales à la circulation sanguine.
Le liquide interstitiel de la tumeur est drainé par vaisseaux lymphatiques (formé par lymphoangiogenèse) et dont le rôle est capital pour la formation de métastases.

II.2.d. Le homing :

C'est un mécanisme de formation de vaisseaux à partir de précurseurs de CE issues de la moelle osseuse et véhiculés dans le sang. Ces précurseurs sont capables de s'incorporer dans les vaisseaux tumoraux d'où le phénomène de homing (Cf. figure 50 C).
Le mécanisme de homing implique la contribution possible des précurseurs de cellules endothéliales circulantes CD 34+, issus de la moelle osseuse ou de l'endothélium dans le mécanisme d'angiogenèse (157-158). Le mécanisme est encore mal connu mais on trouve chez les patients dont la maladie est en progression, un nombre de cellules endothéliales circulantes élevé et corrélé à la production de VEGF (159-160).

II.3. Les étapes de l'angiogenèse tumorale :

Le développement de nouveaux vaisseaux est un processus important dans la progression tumorale et favorise la dissémination des cellules cancéreuses à travers l'organisme. Le niveau de vascularisation est un indicateur du potentiel métastatique pour les cliniciens.

II.3.a. Le déclenchement :

Au fur et à mesure de sa croissance, l'environnement de la tumeur se modifie (appauvrissement en nutriment en gaz, acidification due à la libération de lactate issus de la respiration anaérobie…). L'intérieur de la masse tumorale devient progressivement hypoxique et résulte vraisemblablement de l'augmentation de la stabilité et de l'activité de HIF-1 par les altérations génétiques. En effet, la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur p53 ou PTEN (phosphatase and tensin homolog) observée dans les cancers augmente le taux de HIF1 (161) et également la transcription subséquente de gènes dépendant de HIF-1 (162). La

transformation de l'oncogène v-Src est due à l'induction de HIF et provoque l'augmentation de l'expression de HIF et de ces gènes cibles (163). De même, certains facteurs de croissance surexprimés dans certains types de cancers comme HER-2 augmentent la synthèse de HIF-1 (164).

Par le grand nombre de gènes cibles exprimés, les fonctions induites par HIF-1 confèrent un certain nombre d'avantages aux cellules tumorales. La surexpression de HIF-1 a été corrélée avec la mortalité, le mauvais pronostic et la résistance aux traitements observés chez les patients (165).

Les cellules tumorales entrent alors en hypoxie et déclenchent la libération de facteurs nécessaires à la mise en place de l'angiogenèse tumorale : c'est le switch angiogénique.

II.3.b. Le switch angiogénique :

En dehors de l'hypoxie, l'augmentation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques (Cf. tableau 8) est la conséquence de l'activation d'oncogènes alors que la diminution des facteurs anti-angiogénique peut provenir de la perte d'expression de gènes suppresseurs de tumeur (Cf. tableau 9).

Facteurs les plus fréquemment produits par les tumeurs humaines :		
Abréviation	**PM (Da)**	**Nom du facteur**
VEGF	45000	Facteur de croissance des cellules endothéliales vasculaires
FGF-2	18000	Facteur de croissance des fibroblastes basique
FGF-1	16400	Facteur de croissance des fibroblastes acide
PDGF	40000	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PD-ECGF	45000	Facteur de croissance endothélial dérivé des plaquettes
IL-8	40000	Interleukine-8
HGF	92000	Facteur de croissance des hépatocytes
EGF	6000	Facteur de croissance épidermique
Angiogenine	14100	
Les autres :		
TNF-α	17000	Facteur de nécrose tumorale α
TGF-β	25000	Facteur de croissance transformant α
TGF-α	5500	Facteur de croissance transformant β
Prolifférine	35000	
PLGF	25000	Facteur de croissance placentaire

Tableau 8 : Les différentes molécules pro-angiogéniques sécrétées par cellules tumorales. *(Extrait de Folkman, Current Molecular Medicine, 2003) (166).*

Oncogène	Activité angiogénique affectée
K-ras, H-ras	Sur-régulation de VEGF, PlGF et FGF, régulation négative de TSP-1 et Ang-1
v-src	Sur-régulation de VEGF, régulation négative de TSP-1
c-src	Sur-régulation de VEGF et d'autres facteurs
c-myb	régulation négative de TSP-2
N-myc	régulation négative d'inhibiteurs de l'angiogenèse (activin-A), sur-régulation de l'IL-6
c-myc	Activité angiogénique complexe dans l'épiderme
HER-2	Sur-régulation de VEGF
EGFR	Sur-régulation de VEGF, FGF-2 et IL-8
bcl-2	Induction de VEGF sous hypoxie
PyMT	Régulation négative de TSP-1
c-fos	Expression de VEGF
trkB	Régulation négative de facteurs angiogéniques
HPV-16	Sécrétion du VEGF et IFN-α
v-P3K	Production de VEGF et angiogenèse
MDM-2	Sur-régulation de VEGF
ODC	Facteur angiogénique
PTTG1	Sur-régulation de VEGF et FGF-2
E2a-Pbx1	Induction de l'angiogénine-3 (souris) et VEGF
v-Abl	Sur-régulation de VEGF
Bcr-abl	Sur-régulation de VEGF
v-sis	Sur-régulation de VEGF
PML-RARα	Sur-régulation de VEGF
RhoC	Sur-régulation de VEGF et de cytokines
HHV8	Sur-régulation de VEGF
NOX-1	Sur-régulation de VEGF
elF-4^E	Sur-régulation de VEGF (traduction)
p53	Sur-régulation de VEGF

Tableau 9 : Impact des oncogènes potentiels sur l'angiogenèse. *(Adapté de Rak, Seminars in Cancer Biology, 2004 (167) et du site internet http://www.biooncology.com/research-education/vegf/vegf/vegf-pathway/vegf-production/index.html).*

Malgré une grande hétérogénéité dans les différents types de cancer, le mécanisme de l'angiogenèse tumorale est similaire à l'angiogenèse physiologique. En plus de l'hypoxie induite dans la tumeur, le VEGF est le facteur clé pour le déclenchement de l'angiogenèse tumorale. Il est produit pendant toutes les phases de développement du cancer et dans tous les types de cancer. Les autres facteurs sont sécrétés au fur et à mesure de la progression tumorale (Cf. figure 51).

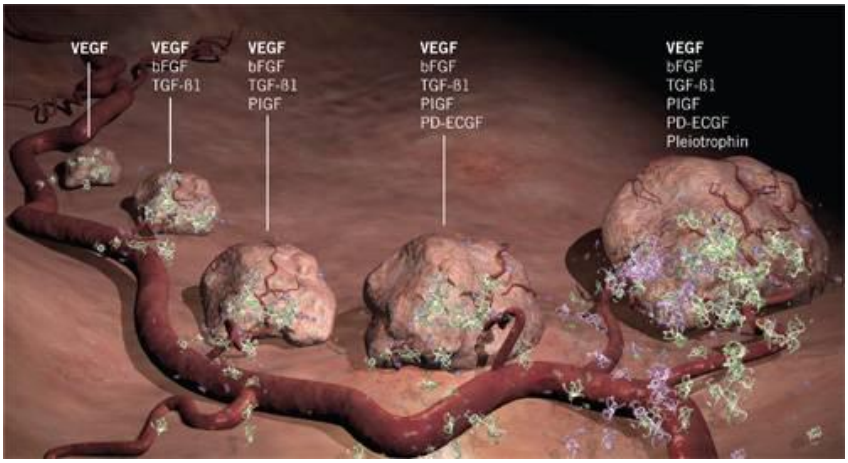


Figure 51 : Expression des différents facteurs de croissance lors de la croissance tumorale. *(Extrait du site internet http://www.biooncology.com/research-education/vegf/ligand/index.html).*

II.3.c. **Les différentes étapes :**

L'angiogenèse tumorale utilise les mêmes mécanismes que l'angiogenèse physiologique : les cellules tumorales court-circuitent ou amplifient les différentes voies de signalisation pour les détourner à leur profit (Cf. tableau 9).

Ligand–receptor	Putative role in physiological angiogenesis	Implicated role in tumour angiogenesis
VEGF–VEGFR1 and VEGF–VEGFR2	Induce proliferation, sprouting and tube formation of endothelial cells; increase vascular permeability; suppress apoptosis for vessel stabilization; upregulate PDGFβ for mural cell recruitment	Recruitment of immune cells in suppressing anti-tumour immune response; recruitment of immune cells in promoting tumour growth and angiogenesis; promote sustained angiogenesis
VEGFC–VEGFR3–NRP2	Lymphatic development	Lymphatic-mediated metastasis
Notch pathway	Negative feedback for VEGF-mediated vessel sprouting and participates in vessel fate determination (arterial compared with venous)	DLL4 expression upregulated in cancer and DLL4 inhibition *in vivo* result in non-productive vasculature and inhibits tumour growth
Ephrin-B2–EPHB4	Arterial compared with venous endothelial cell specialization determination; guides vessel branching	Expression and role in tumorigenesis may be cell type dependent
PDGF-BB–PDGFRβ	Promotes migration, recruitment and proliferation of mural cells	Recruitment and survival of tumour- and tumour vasculature-associated stromal cells; mediates TGFβ-induced epithelial–mesenchymal transition
ANGPT1–TIE2	Faciliates EC–matrix and EC–mural cell interaction for vessel stabilization; suppresses EC apoptosis	Role in tumorigenesis may be dependent on cell type and ANGPT2 levels
ANGPT2–TIE2	Induces EC apoptosis in absence of VEGF; participates in lymphatic patterning	Recruitment of tumour-associated TEMs; promotes VEGF-mediated tumour neovascularization
TGFβ1–TGFβRII	Promotes ECM and protease production; promotes differentiation of fibroblasts to myofibroblasts and mesenchymal cells to mural cells	Promotes angiogenesis by inducing VEGF expression and pro-tumorigenic phenotypes of associated stroma cells

ANGPT, angiopoietin; DLL4, delta-like ligand 4; EC, endothelial cell; ECM, extracellular matrix; NRP2, Neuropilin 2; PDGF, platelet-derived growth factor; TEMs, TIE2-expressing monocytes; TGF, transforming growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor.

Tableau 10 : Les différentes voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. *(Extrait de Chung, Nature Rev Cancer, 2010) (154)*.

II.3.c.1. Le déroulement de l'angiogenèse tumorale :

Les facteurs pro-angiogéniques libérés par la tumeur en réponse à l'hypoxie et à l'activation des oncogènes provoquent le découvrement des péricytes et l'activation des cellules endothéliales (Cf. figure 52). Les métalloprotéases libérées dégradent la matrice et permettent la migration des CE vers la source du stimulus. Les CE prolifèrent et les tubes se forment.

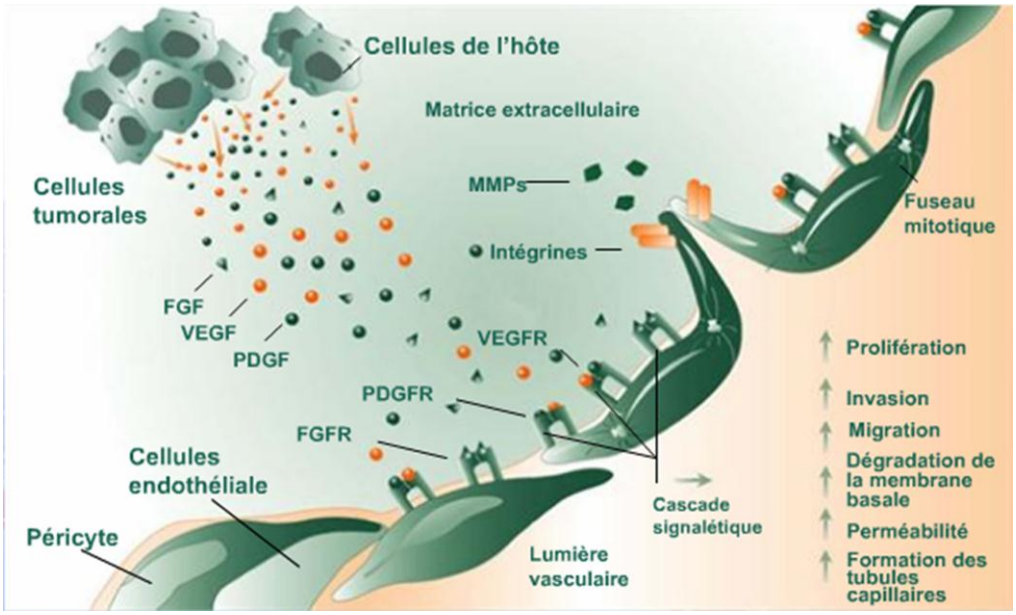


Figure 52 : Mécanisme de l'angiogenèse tumorale.

Seulement, lors de cette angiogenèse tumorale, il n'y a pas de véritable phase de maturation des vaisseaux. Le recouvrement de l'endothélium par les péricytes est anormal et les jonctions sont incomplètes. Au final, les vaisseaux tumoraux sont mal formés d'où l'augmentation de la perméabilité vasculaire observée dans les tumeurs.

La tumeur est entourée d'un tissu appelé stroma contenant de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules inflammatoires et les macrophages. Ces cellules participent également au processus d'angiogenèse et de progression tumorale.

II.3.c.2. Rôles des autres cellules

Les fibroblastes associés aux tumeurs (TAFs).

Les fibroblastes associés aux tumeurs ou TAFs peuvent provenir des fibroblastes environnants ou de CML, CE ou de précurseurs mésenchymateux issus de la moelle osseuse.
Les fibroblastes sont impliqués dans la synthèse, le dépôt et le remodelage de la MEC (154).
Les cellules cancéreuses recrutent ces fibroblastes et les activent. Ceux-ci synthétisent à leur tour des facteurs paracrines capables d'influencer la croissance des cellules tumorales et également d'induire l'angiogenèse.
Les TAFs peuvent sécréter la chimiokine CXCL-12 et permettent ainsi le recrutement des progéniteurs endothéliaux depuis la moelle osseuse (168).
Les TAFs dérivés des tumeurs résistantes aux agents anti-VEGF produisent de fort taux de facteurs pro-angiogéniques tels que le PDGF-C, l'Ang-2 et la cyclooxygénase-2 (COX2) par rapport aux TAFs des tumeurs qui répondent aux traitements (169). Le PDGF-C est impliqué dans l'angiogenèse (169), le recrutement des fibroblastes (170-172) et la stimulation de la croissance tumorale par un mécanisme autocrine (173). Les PDGF sont également capables de recruter les péricytes permettant la stabilisation des vaisseaux réfractaires aux traitements anti-VEGF (174).

Les monocytes et les macrophages

Dans de nombreuses tumeurs solides, des macrophages sont recrutés par les molécules chimio-attractantes sécrétées par les cellules cancéreuses comme le CS-CSF (colony stimulating factor 1), CCL-2, CCL-5 et VEGF (175-177). La présence de ces cellules corrèle avec une augmentation de la densité vasculaire et un mauvais pronostic (178).
Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) s'accumulent dans les régions nécrotiques avasculaires des tumeurs à un stade avancé ; ils expriment HIF1-α et HIF2-α conduisant à l'expression de nombreux gènes impliqués dans la néovascularisation (VEGF, tumour necrosis factor-α (TNFα), interleukin-8 (IL-8), FGF, IL-1β, MMP9 and semaphorin 4D135).
Les TAMs restent présents dans la tumeur, contrairement aux macrophages impliqués dans la cicatrisation qui sont éliminés à la fin du processus de réparation.

Les mastocytes :

Encore une fois, l'accumulation de ces cellules en périphérie est associée avec une augmentation de la vascularisation et un mauvais pronostic dans un grand nombre de cancer (179). Ces cellules sont recrutées par le SCF (stem cell factor), l'IL-3 et l'adrénomédulline (179). Elles secrètent également des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le FGF-2, l'IL-8, le TGF-β, le TNF-α, l'ANG-1 et les sérines protéases (180).

Il a été montré dans un modèle de lymphome chez la souris, que l'induction de c-myc conduit au recrutement des mastocytes nécessaires pour l'angiogenèse et donc pour la progression tumorale (181).

Les cellules myéloïdes CD11b+Gr1+ :

C'est une population cellulaire hétérogène comprenant les granulocytes, les cellules dendritiques et les monocytes, mais également les cellules supresseurs dérivées de la moelle (MDsCs). Il a été montré que les patients cancéreux avaient un nombre plus élevé de précurseurs myéloïdes dans leur sang et dans les échantillons tumoraux (182-183).

MDsCs sont recrutés par de nombreux facteurs libérés par la tumeur comme le VEGF-A, le CSF (colony-stimulating factors), les prostaglandines, CCL2 et de nombreuses interleukines (184).

Il a été montré que les cellules CD11b+Gr1+ étaient impliquées dans la résistance des tumeurs vis-à-vis des traitements (185). Le GC-CSF (granulocyte colony stimulating factor) est produit par les cellules tumorales ou stromales pour mobiliser ces cellules CD11b+Gr1+ au niveau de la tumeur. En retour, celles-ci produisent le facteur pro-angiogénique Bv8, lequel induit la prolifération et la migration des CE (186) aussi bien que la production et la mobilisation des cellules myéloïdes (187). Ainsi GC-CSF et Bv8 permettent l'approvisionnement en continu des cellules immunitaires au niveau de la tumeur et favorisent ainsi l'angiogenèse même si VEGF-A est bloqué (179, 185). Bv8 est induit par un stress hypoxique (187).

Les cellules myéloides matures comme les neutrophiles sont attirées par chimiotactisme et jouent un rôle important dans l'angiogenèse physiologique et pathologique par sécrétion de VEGF-A et de MMP (MMP-9) (179, 185, 188).

Enfin, les cellules présentatrices de l'antigène sont responsables de l'élimination des intrus par médiation de la réponse immunitaire. Elles sont également impliquées dans l'angiogenèse tumorale (179).

II.4. Les thérapies ciblées

Les traitements conventionnels utilisés pour lutter contre le cancer sont des traitements locaux ou régionaux (chirurgie, radiothérapie), des traitements généraux (chimiothérapie, hormonothérapie, immunothérapie) ou des traitements palliatifs permettant d'améliorer la qualité de vie du malade. La thérapie néo-adjuvante est une chimiothérapie faite en première intention pour faire diminuer le volume de la tumeur et la rendre opérable.
Seulement ces thérapies ne sont pas très spécifiques et sont difficiles à supporter à cause de leurs nombreux effets secondaires. De plus, les vaisseaux tumoraux ne sont pas bien perfusés et les traitements arrivent difficilement jusqu'à la tumeur. De même, l'absence d'oxygène ne permet pas une bonne efficacité des photothérapies. Néanmoins, l'identification de marqueurs moléculaires spécifiques des cellules tumorales a conduit au développement d'un autre type de thérapie : la thérapie ciblée.

La plupart des agents utilisés lors des thérapies ciblées sont cytostatiques (contrairement à la chimiothérapie et radiothérapie qui sont cytotoxiques) et se focalisent sur une cible spécifique bloquant une fonction indispensable au développement et à la progression tumorale. Ils permettent donc de traiter le cancer à un niveau individuel en tenant compte du phénotype cancéreux et nécessitent un dépistage moléculaire de la tumeur (sur une biopsie) avant toute prescription.
Dans un premier temps, ces nouveaux traitements ont été utilisés seul en combinaison avec les traitements conventionnels. Ils sont maintenant utilisés en association afin de bloquer plusieurs voies et ainsi obtenir un effet plus important en évitant les phénomènes de résistance.
Plusieurs stratégies ont été envisagées par les industriels dont certaines ont obtenu une autorisation de mise sur le marché ou sont en cours d'essai clinique (Cf. figure 53). Les principales cibles sont :

- les récepteurs surexprimés dans les cancers (comme EGFR, HER-2, VEGFR, IGFR, PDGFR…),
- les molécules impliquées dans le transfert du signal en aval des récepteurs (comme les protéines Ras, Raf, MEK, mTor, PI3K, AKT),
- les molécules impliquées dans le cycle cellulaire (CDK),
- les molécules impliquées dans l'apoptose (Bcl-2, ABL,),
- …

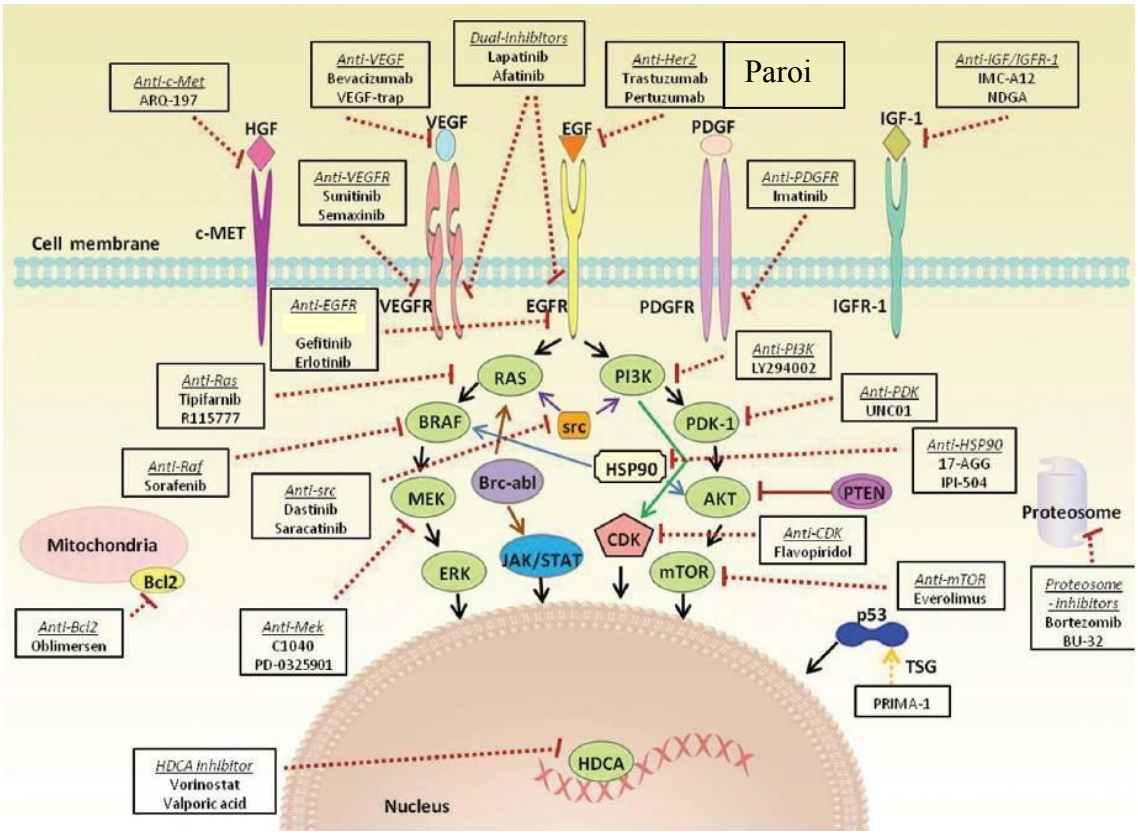


Figure 53 : Représentation des différentes cibles des thérapies ciblées anti-tumorales et leurs principaux agents thérapeutiques. (Adapté de Munagala, Indian Journal of pharmacology, 2011) (189).

Le suffixe du principe actif de ces médicaments donne des précisions sur la nature de la molécule : Ŕmab (anticorps monoclonaux de souris), .Ŕximab (anticorps chimériques Homme-Souris), Ŕzumab (anticorps humanisés à ≈ 90%), Ŕmumab (anticorps humanisés à ≈ 95-99% (par génie génétique), Ŕnib (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase).

D'autres molécules ont une action sur la croissance tumorale en empêchant :

- leur migration : elles agissent sur la kinase Src ou les protéases de la matrice (MMP, ADAM),

- la synthèse de l'ADN : elles agissent sur le remodelage de la chromatine (télomérase, histone, méthylation)

- le renouvellement des protéines : elles agissent sur le protéasome ou les protéines de choc thermique (HSP) (Cf. tableau 11).

D'autres molécules impliquées dans l'apoptose et non représentées dans la figure 49 sont également présentées dans le tableau 11.

Voie atteinte		Cible première	Autres cibles	Médicaments
Migration		SRC (TKI)		saracatinib (AZD0530), Sprycel® (dasatinib, BMS-354825), bosutinib (SKI-606)
		MMP	MMPs	marimastat (BB-2516), prinomastat (AG3340), metastat (CMT-3, COL-3, Collagenex), tanomastat (BAY 12-9566), SB-3CT, INCB7839
			MMP-2	SB-3CT
			ADAM	INCB7839
Remodelage de la chromatine	**télomérase**	hTRC		AZT, imetelstat (GRN163L), rhodacyanine (FJ-5002), BIBR1532, hTERT (vaccin)
	histones	HDAC		SAHA, depsipeptide, Istodax® (romidepsine), Zolinza® (Vorinostat), mocetinostat, belinostat (PXD101), panobinostat (LBH589), MGCD-0103
	méthylation	DNA-méthyl transférase		Vidaza™ (5-aza-cytadine), Dacogen™ (décitabine)
Renouvellement des protéines	**protéasome**			Velcade® (Bortezomib), carfilzomib, MLN-978, ONX-912 CEP-18770 et 28331,
	HSP	HSP-90		geldanamycine, novobiocine, alvespimycine (17-DMAG), tanespimycine (17-AAG/KOS-953), retaspimycine (IPI-504), ganetespib
Apoptose		Bcl-2		apogossypol, Telcyta® (TLK-286), ABT-263, danusertib (PHA-739358)
		Protéine kinase	pan-BCR-ABL VEGFR2 FGFR1, PDGFRα, FLT3 LYN	ponatinib (AP24534),
			PKC, PKA,PKG, p60v-src tyrosine protein kinase, CaM kinase II	staurosporine (K252C), midostaurin (PKC412), stauprimide.
		IUAP		AEG35156 (smac)
		TRAILR-1		mapatumumab (HGS-ETR1)
		PARP		BSI-201, MK 4827 olaparib (AZD2281), véliparib,

Tableau 11 : Récapitulatif des différentes thérapies ciblées. *(Adapté du site internet Info cancer (http://www.arcagy.org/infocancer/) et du site internet Drug Bank (* http://drugbank.ca/*))*

Cas des anticorps dirigés contre EGFR :

Le ciblage d'EGFR peut être réalisé avec des agents comme le panitumumab et le cetuximab, anticorps monoclonaux qui se fixent sur la région extracellulaire du récepteur et empêchent la liaison du ligand (Cf. figure 54 partie droite). L'hétérodimérisation du récepteur n'a plus lieu et le complexe récepteur-anticorps est internalisé dans les vésicules d'endocytose pour être éliminé. Ces molécules favorisent également la réaction immunitaire par ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity) par le fragment Fc de l'anticorps.

Ces deux anticorps sont utilisés en clinique pour le traitement des tumeurs des VADS : le cetuximab a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) et est utilisé en association avec la radiothérapie alors que le panitumumab est en phase II d'évaluation en Espagne pour le traitement des cancers des VADS récurrents et métastatiques (en première ligne en association avec la chimiothérapie) (site internet Orphanet, http://www.orpha.net/).

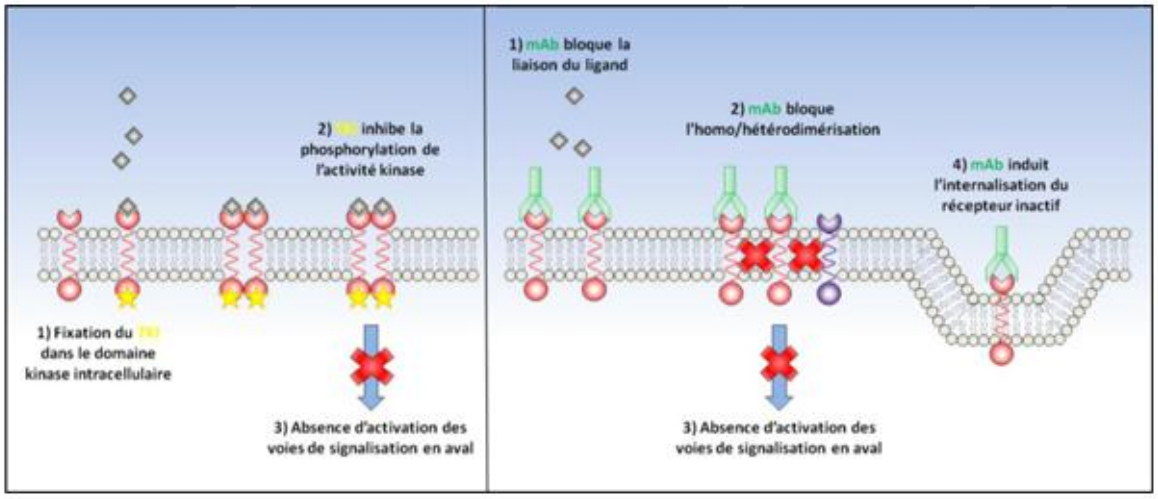


Figure 54 : Mode d'action des molécules ciblant les récepteurs à activité tyrosine kinase. Exemple des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase du récepteur RTK (à gauche) et des molécules ciblant le domaine de liaison au ligand (à droite). *(Extrait de la thèse de M. Rebucci , Ecole Doctorale Biologie-Santé Lille II, 2010).*

Cependant, seulement 20 % des patients répondent aux traitements anti-EGFR. Ceci peut s'expliquer par la présence de certaines mutations au niveau des protéines activatrices situées en aval du récepteur comme c'est le cas pour la protéine K-RAS ou PI3K. De nouvelles stratégies ont ainsi été développées afin de contourner le problème et un génotypage complet de la tumeur est nécessaire afin de pouvoir offrir une thérapeutique adaptée au patient (Cf. figure 53).

De plus, l'apparition de résistance au cours de ce type de traitement a conduit au développement de thérapies ciblant directement les vaisseaux tumoraux : les thérapies anti-angiogéniques.

II.5. Les thérapies anti-angiogéniques

Le professeur Folkman a formulé au début des années 70 une hypothèse qui a conduit au développement de la thérapie anti-angiogénique : « les vaisseaux sanguins permettent le développement de la tumeur en lui apportant toute la nourriture dont elle a besoin. Si on bloque cette vascularisation, on la fait mourir de faim ».
La preuve du concept de ce type de thérapie a été donnée par le premier médicament mis sur le marché : un inhibiteur de l'agent pro-angiogénique VEGF. Depuis, d'autres stratégies ont été développées (Cf. figure 55).

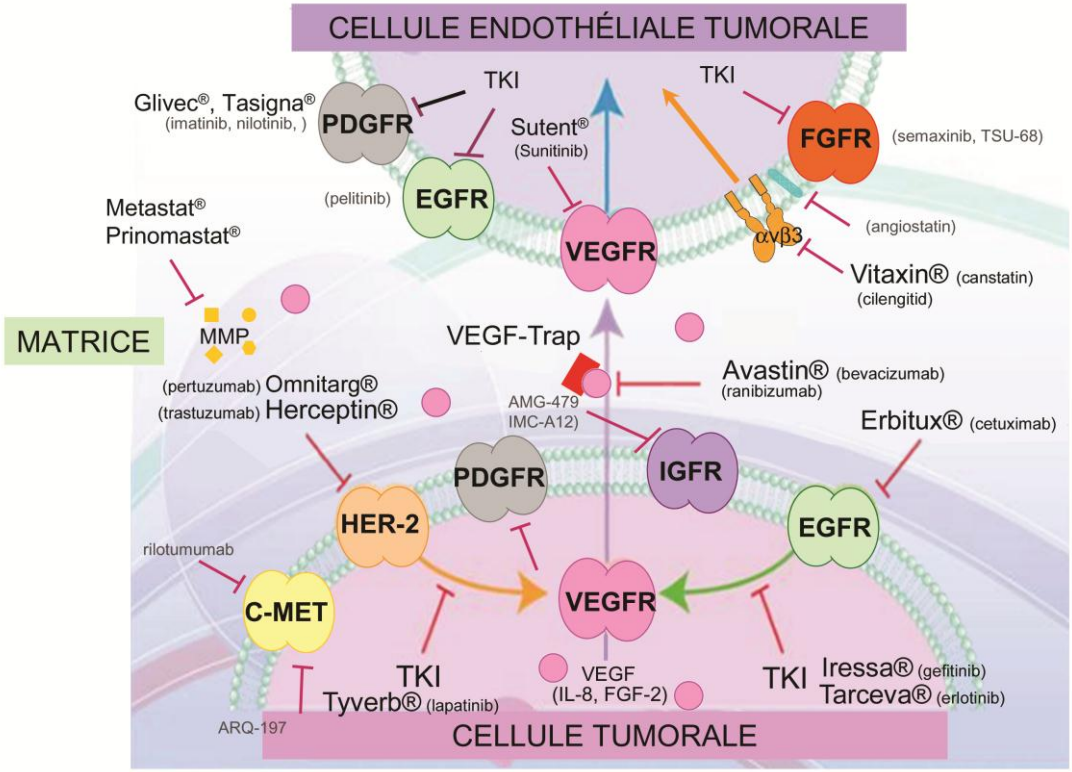


Figure 55 : Les différentes cibles impliquées dans les thérapies ciblées anti-angiogéniques et leurs principaux agents.

Les thérapies anti-angiogéniques n'éliminent pas les cellules tumorales mais les empêchent de proliférer. Elles sont donc associées comme adjuvant aux thérapies conventionnelles.
De plus, les molécules thérapeutiques offrent l'avantage de ne toucher que les cellules endothéliales tumorales ou angiogéniques. En effet, les CE normales sont quiescentes et ne

prolifèrent quasiment pas. De plus, les récepteurs endothéliaux des vaisseaux normaux sont masqués par les péricytes et ne peuvent donc pas être ciblés par cette thérapeutique.

Enfin, ces thérapies permettent de normaliser la vascularisation et d'offrir une meilleure délivrance des thérapeutiques conventionnelles. Leurs mécanismes d'action sont présentés dans le tableau 12.

Nom de la molécule	Effet sur la cellule endothéliale
Angiostatine	Fragment du plasminogène. Se lie à l'ATP synthase, angiomotine et l'annexine-II sur les CE et inhibe leur croissance, leur prolifération et leur migration.
Arrestine	Fragment du collagène IV. Se lie à l'intégrine α1β1 et inhibe la prolifération, la migration, la formation de tube et la néovascularisation.
Bevacizumab (Avastin®)	Anticorps humanisé anti-VEGF
Canstatine	Fragment du collagène IV. Se lie à l'intégrine αvβ3 et inhibe la prolifération, la migration et la formation de tube.
Combretastatine	Se lie à la tubuline constituant des microtubules impliqué dans la réorganisation du cytosquelette d'actine et le bourgeonnement de la membrane des CE
Delta-like ligand 4(DII4)	Molécule se liant au récepteur notch et induit la régulation négative de VEGF : inhibiteur potentiel du bourgeonnement
Endostatine	Fragment du collagène XVIII. Se lie à l'intégrine α5β1 et inhibe la prolifération, la migration des CE capillaires et induit l'apoptose des CE prolifératives.
Heparinases	Permet l'élimination des récepteurs à héparanes sulfate nécessaire pour la croissance des CE induite par les facteurs de croissance et la néovascularisation.
Interleukines	IL-4 inhibe la migration des CE, IL-12 induit l'IFN, favorise l'apoptose des CE.
Kringle 5 fragment	Fragment recombinant humain du plasminogène. Inhibe la prolifération et la migration des CE.
NM-3	Isocoumarine, petite molécule inhibant VEGF et inhibe sélectivement la prolifération des CE, le bourgeonnement et la formation de tube *in vitro*.
PEDF (Pigment epithelial-derived Factor)	Induit la mort des CE et bloque la prolifération des CE induite par le FGF-2 et le VEGF.
Rétinoïdes	Inhibition de la prolifération et de la différentiation des CE. Diminue également la libération du VEGF par les kératinocytes.
Thrombospondine	Se lie au VEGF et empêche sa liaison avec les CE : inhibe la migration des CE et la néovascularisation mais ne semble pas être spécifique des CE.
Troponine	Dérivé du cartilage. Inhibe la formation de tube et la division des CE ; diminue la production de VEGF.
Tumstatine	Fragment du collagène IV. Se lie à l'intégrine αvβ3 et inhibe la prolifération des CE et la néovascularisation.
Vitaxin	Anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine αvβ3.

Tableau 12 : Inhibiteurs direct de l'angiogenèse et leur mécanisme d'action. *(Adapté de Kerbel, Nat Rev Cancer, 2002, Bhadada, Fundam Clin Pharmacol, 2011) (190) (191).*

Certaines molécules dirigées notamment contre certains récepteurs des facteurs de croissance offrent l'avantage de cibler non seulement les cellules vasculaires mais également les cellules tumorales et possèdent donc un effet anti-angiogénique indirect (Cf. tableau 13).

Cible : les récepteurs	**Autres cibles**	**Nom de la molécule**
EGFR		cetuximab (Erbitux®,IMC225), panitumumab (Vectibis®), matuzumab
EGFR-TK		gefitinib (Iressa®, ZD1839) erlotinib (Tarceva®, OSI774), pelitinib (EKB569)
HER	EGFR-1	trastuzuma (Herceptin®), pertuzumab (Omnitarg®), nimotuzumab, perutuzumab
HER-2 TK	EGFR-1 TKI EGFR-1TKI, ERK-1 et 2, AKT kinases	trastuzumab (Herceptin®) afatinib (BIBW-2992) lapatinib (Tyverb®),
FGFR	VEGFR-1, PDGFR-β VEGFR-2, PDGFR-β VEGFR, PDGFR, FTL-3, c-KIT	TSU-68 (SU6668) semaxinib dovinitinib (TKI258)
PDGFR	**Bcr**/Abl , c-KIT **Bcr-**ABL, c-KIT **Bcr-**Abl, SRC TK, EphA2, c-KIT	imatinib (Glivec ®), nilotinib (Tasigna®), dasatinib (Sprycel®),
VEGFR	PDGFR-α/β et c-KIT PDGFR et KIT PDGFR, c-KIT et FLT3 PDGFR-α/β et c-KIT PDGFR-α et -β, c-KIT, flt-3 PDGFR-β, kinases de Raf, FLT-3, c-KIT PDGFR-α/β et c-KIT, c-FMS Ret, EGFR	axitinib (Aguron®) cediranib (Resantin®) linifanib, pazopanib (Votrient®, GW786034), sunitinib (Sutent®, SU11248), sorafenib (Nexavar ®), vatalanib (PTK787), vandetanib (Zactima®, ZD6474),
Récepteur à l'interféron IFN-α		IFN- α

Tableau 13 : Inhibiteurs de l'angiogenèse impliqués dans l'inhibition des récepteurs. *(Adapté de Kerbel, Nat Rev Cancer, 2002, Bhadada, Fundam Clin Pharmacol, 2011) (190) (191).*

Cas des anti-VEGFR ciblant le domaine tyrosine kinase

Les molécules ciblant le domaine tyrosine kinase du récepteur VEGFR sont des petites molécules synthétiques qui pénètrent à l'intérieur de la cellule, rentrent en compétition avec l'ATP pour se lier au site actif du récepteur (Cf. figure 56) et empêchent la phosphorylation du récepteur même en présence du ligand (Cf. figure 54, partie gauche). Ces inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (TKI) possèdent tous le suffixe « nib ».

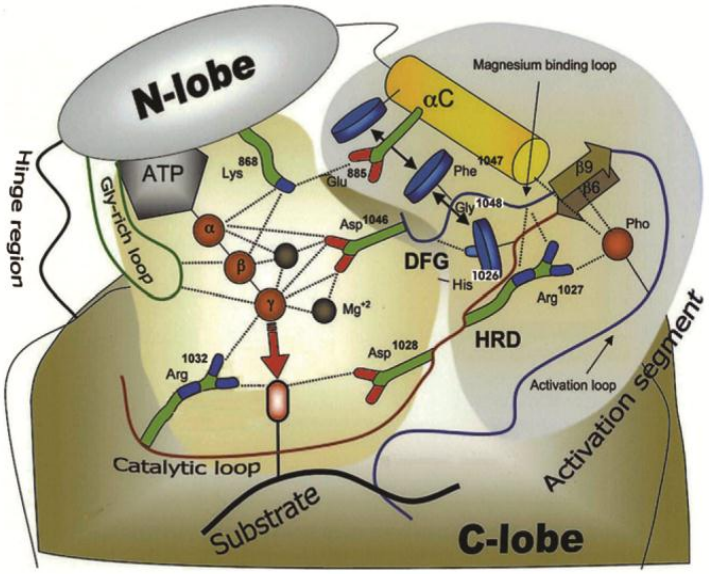


Figure 56 : Représentation des interactions entre l'ATP et le site actif du récepteur VEGFR-2. *(Extrait de Roskoski, Biochem and Biophys Res Commun, 2008) (192).*

Ces molécules anti-VEGFR-2 ne sont généralement pas spécifiques de ce récepteur, elles sont également capables d'inhiber d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase. Par exemple le sunitinib est capable d'inhiber les récepteurs PDGFR-α et -β, c-KIT, Flt-3 alors que le dovinitinib inhibe les récepteurs PDGFR, FTL-3, c-KIT ou encore le vandetanib permet l'inhibition de Ret et d'EGFR. (Cf. tableau 13). Ainsi, les thérapies anti-angiogéniques peuvent offrir un double avantage en ciblant à la fois les vaisseaux tumoraux et la tumeur, augmentant ainsi leur efficacité.

II.6. Récapitulatif des différentes thérapies

L'arsenal thérapeutique est maintenant dirigé contre l'ensemble des caractéristiques des cellules cancéreuses (Cf. figure 57) et offre de nouvelles perspectives pour le traitement des cancers.

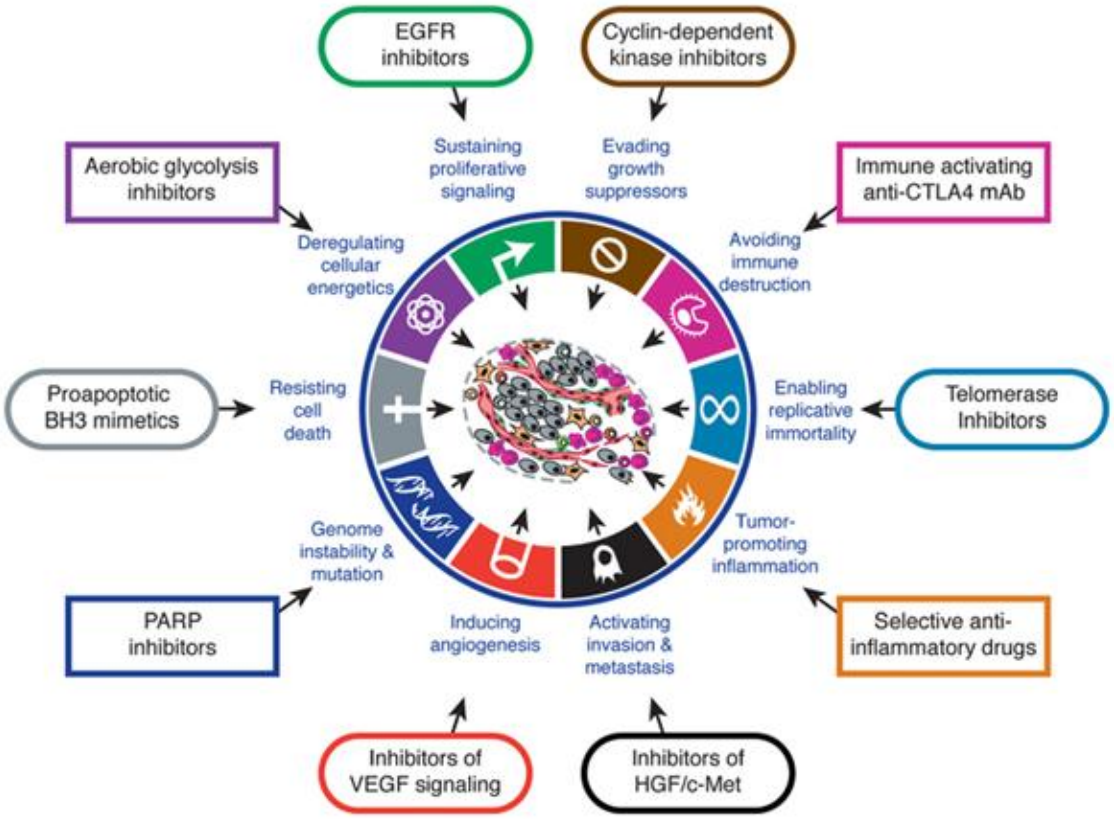


Figure 57 : Ciblage thérapeutique des caractéristiques des cancers. *(Extrait de Hanahan, Cell, 2011) (114).*

PARTIE 4 :

Les microvésicules tumorales

I. Les microvésicules :

I.1. Définition

Les microvésicules (MV) sont des petits fragments cellulaires circulaires relargués par la plupart des cellules eucaryotes pendant l'apoptose ou après activation. Elles sont détectées dans les différents fluides biologiques chez des sujets sains mais également, en quantité plus importante, dans de nombreuses pathologies dont le cancer (193). Aussi, les microvésicules sont de plus en plus reconnues comme marqueur de pronostic dans différentes maladies et ouvrent de nouvelles voies de recherche à des fins thérapeutiques.

On distingue trois types de microvésicules :

- **les exosomes** : ce sont des nanovésicules contenues dans les corps multivésiculaires intracellulaires (organelle intracellulaire du système endosomal). Elles sont libérées par exocytose après la fusion de ces corps multivésiculaires avec la membrane plasmique. La population des exosomes est la petite et la plus uniforme en taille et en forme des microvésicules, avec un diamètre compris entre 30 et 100 nm. On peut les séparer des autres microvésicules à l'aide d'un gradient de sucrose ou par ultracentrifugation à 100 000G.

- **les microparticules proprement dites** ou « shedding » microvésicules sont relarguées à partir de la surface cellulaire sans affecter la viabilité de la cellule (194). La population de ces microvésicules est plus hétérogène en taille que celle des exosomes avec un diamètre compris entre 0,1 et 1 μm. Leur nom diffère selon la cellule d'origine : les microparticules (MP) sont relarguées par les cellules sanguines (les plaquettes, les monocytes ou les leucocytes) après activation ; les microvésicules (MV) sont relarguées par les autres types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les cellules souches embryonnaires et les microvésicules tumorales (TMV) sont relarguées, comme leur nom l'indique, par les cellules tumorales.

- **les corps apoptotiques** : ce sont des particules relarguées par les cellules en stade final de l'apoptose (ou mort cellulaire programmée). Les corps apoptotiques sont des particules plus grosses avec un diamètre généralement supérieur à 1 μm (normalement de 1 à 4 μm).

Les exosomes font l'objet de nombreuses études dans le domaine de la cancérologie contrairement aux microvésicules proprement dites. De plus, les microvésicules sont impliquées dans l'angiogenèse ; c'est pourquoi nous nous sommes intéressés uniquement aux microvésicules tumorales (TMV).

I.2. Composition :

La composition des microvésicules dépend du type de la cellule d'origine mais également du mécanisme de relargage ou du stimulus d'activation (Cf. figure 58).

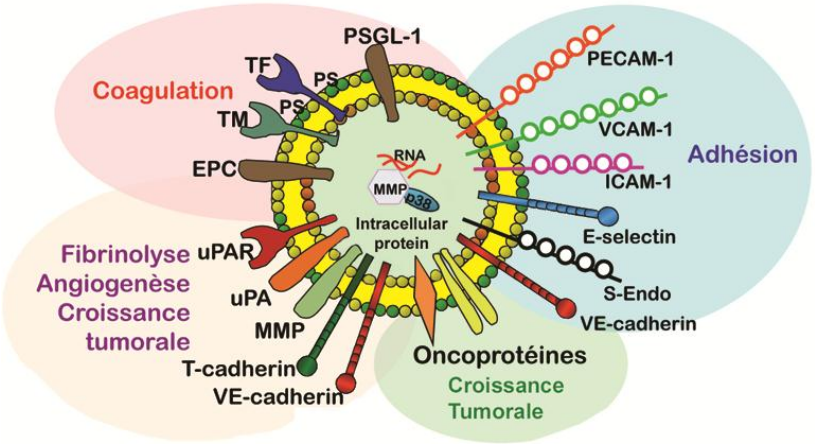


Figure 58: Représentation schématique des différentes molécules transportées par les microvésicules tumorales. *(Adapté de Leroyer, VEGF Actu, N° 23 Juin 2011) (195).*

Les microvésicules sont délimitées par une bicouche lipidique dont la composition et la distribution des phospholipides sur les 2 feuillets restent constantes. Les PS (phosphatidyl sérine) négativement chargés et les PE (phosphatyl éthanolamine) électriquement neutres sont situés sur le feuillet externe de cette membrane. Il est à noter que les rafts lipidiques, région particulière de la membrane riche en cholestérol, sont particulièrement observés dans les MV.
La membrane des microvésicules contient des protéines membranaires typiques de la cellule d'origine permettant de déterminer leur origine cellulaire. Néanmoins les microvésicules sont capables d'acquérir et de transmettre des antigènes différents de ceux de la cellule émettrice (193). En effet, des études récentes suggèrent qu'un grand nombre de protéines sont sélectivement incorporées dans les microvésicules (196). Enfin, toutes les protéines membranaires de la cellule d'origine ne sont pas nécessairement incorporées dans les MV.

Certaines protéines semblent communes à la majorité des MV comme la protéine chaperonne HSP70 ou les protéines tétraspanes, protéines très conservées et régulant de nombreuses fonctions cellulaires par leurs interactions avec, entre autre, des protéines kinases, des récepteurs de facteur de croissance et des transporteurs membranaires.
Le contenu intracellulaire des MV est composé de protéines cytoplasmiques de la cellule mère (telles que les protéines de choc thermique ou des enzymes), des acides nucléiques (ARNm, ARNmi, ADN).

Ainsi, les microvésicules tumorales contiennent des facteurs solubles, des récepteurs membranaires, des oncoprotéines et des suppresseurs de tumeurs mais également des acides nucléiques (Cf. tableau 14 ci-dessous) :

	Molécule transportée	**Fonction**
Facteurs solubles	VEGF, FGF, IL-8 IL-6, IL-1 MMPs, TIMPs	Facteur angiogénique Cytokine inflammatoire Régulateur de la protéolyse
Récepteurs membranaires	CCR-5, CCR-6 TNFR1 (p55) EGFR AXL FasL (Fas ligand)	Récepteur chemokine Récepteur de cytokine Récepteur tyrosine kinase (RTK) Kinase impliquée dans la leucémie Ligand de la mort cellulaire
Oncoprotéines et suppresseurs de tumeur:	EGFR EGFRvIII HER-2, MET K-ras Akt PTEN	EGFR oncogénique EGFR mutant RTK oncogénique GTPase oncogénique kinase oncogénique Suppresseur de tumeur
Lipides:	sphingomyéline	Signalisation cellulaire, angiogenèse
Acides Nucléiques:	mRNA: VEGF, HGF, IL-8, mRNA : EGFRvIII Oncomirs (miR-520g) DNA	facteur angiogenique receptor oncogénique Dans les tumeurs cérébrales Dans les microparticles apoptotiques

Tableau 14 : Composition des microvésicules tumorales. *(Adapté de Lee, Semin Immunopathol, 2011) (197).*

Certaines molécules impliquées dans la régulation de l'angiogenèse ont été retrouvées dans les TMV issues de carcinome humain (198-200) comme la MMP-2, la MMP-9 et l'uPA (194). La β1-intégrine a également été retrouvée à leur surface (201) ; celle-ci peut interagir avec la matrice extracellulaire (comme le collagène et la fibronectine) et est impliquée dans la régulation de l'angiogenèse (202-203).

De même, des cellules cancéreuses humaines (dont le mélanome, le carcinome du colon, le cancer des VADS et le cancer de l'ovaire) produisent un grand nombre de microvésicules portant des molécules pro-apototiques telles que FasL (Fas ligand) et TRAIL (tumor necrosis factor (TNF)Ŕrelated apoptosis-inducing ligand). Ces microvésicules sont impliquées dans la destruction des cellules du système immunitaire (204).

I.3. Mécanisme de formation :

Les microvésicules sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'extérieur suivi d'une scission sans que la viabilité de la cellule d'origine ne soit affectée (Cf. figure 59). C'est un processus actif qui nécessite une stimulation des cellules eucaryotes. Par exemple, les cellules endothéliales peuvent être activées par les protéines présentes dans le sérum (FGF-2 et VEGF) (194). Mais ce processus est réalisé de manière constitutive par les cellules prolifératives et invasives telles que les cellules cancéreuses *in vitro* and *in vivo* et peut être augmenté par les facteurs angiogéniques, l'hypoxie ou le stress de cisaillement (205). La transformation des cellules cancéreuses participe à la libération des TMV. En effet, il a été montré chez la souris que la perte du gène suppresseur de tumeur p53 conduisait à une augmentation du relargage des MV portant le facteur tissulaire (TF) (199, 206). De même, il a été montré que l'acquisition d'oncogènes mutants comme K-ras (199) ou EGFR (207) était impliquée dans l'acquisition du relargage des TMV par les cellules tumorales.

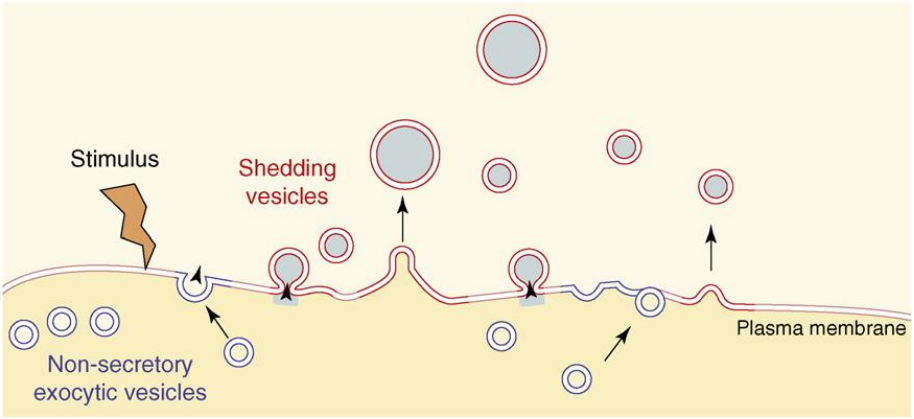


Figure 59. Mécanisme de formation des microvésicules. *(Extrait de Cocucci, Trends in cell biology, 2009) (208).*

Dans les cellules au repos, les 2 feuillets de la bicouche de la membrane plasmique a une composition lipidique spécifique : la phosphatidyl sérine (PS) et la phosphatidyl éthanolamine

(PE) sont séquestrés dans le feuillet interne alors que la phosphatidyl choline (PC) et la sphingomyéline (SM) sont enrichis dans le feuillet externe.

La distribution lipidique de la membrane est sous le contrôle de 3 acteurs majeurs :

- La flippase est une pompe spécifique du transport des aminophospholipides vers le feuillet interne. Elle est spécifique de PE et de PS et est inhibée par l'augmentation du calcium cytoplasmique (Ca^{2+}).
- La floppase est une pompe à aminophospholipide dirigée vers l'extérieur de la membrane. Elle est dépendante de l'ATP et n'a pas de spécificité particulière vis-à-vis des aminophospholipides.
- La scramblase à lipide favorise la redirection non spécifique bidirectionnelle des phospholipides à travers la membrane (transport aspécifique bidirectionnel). Elle est activée par l'augmentation du calcium cytosolique (209).

La stimulation cellulaire s'accompagne d'une augmentation significative et soutenue de Ca^{2+} cytosolique, ce qui a pour effet de stimuler la scamblase et la floppase et d'inhiber en même temps la flippase. Une translocation rapide de PS et PE se produit depuis le feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique, suivie d'un influx lent de la PC et SM vers le feuillet interne, produisant un déséquilibre transitoire de masse (surcharge lipidique) dans le feuillet externe au détriment du feuillet interne. Ainsi il y a plus de PS et de PE dans le feuillet externe.

L'asymétrie de répartition et l'agrégation des lipides à l'intérieur de la membrane plasmique entrainent des tensions à l'origine de la formation de bulles. De plus, les protéines peuvent altérer la courbure de la membrane par plusieurs mécanismes en exerçant une force locale. En effet, certaines protéines, en se liant à la surface membranaire, peuvent appuyer sur celle-ci induire son plissement (en ajoutant leur énergie d'interaction et de conformation au système). Elles peuvent également agir en insérant des fragments amphiphiles dans la matrice lipidique. Dans ce dernier cas, les protéines agissent comme un coin pour forcer la courbure et conduisent à une augmentation de la surface sur un seul feuillet.
Les protéines contractiles peuvent également apporter des forces de traction ou de contraction à un feuillet, créant ainsi une asymétrie structurelle permettant la flexion.

La dégradation du cytosquelette dépendante de Ca^{2+} se produit en même temps que l'asymétrie phospholipidique. En effet, les ions calcium induisent l'activation de certaines protéases et conduisent à une rupture dans le réseau du cytosquelette. Cette dégradation permet le bourgeonnement de la membrane (210).

Le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) joue un rôle important dans l'attachement de la membrane au cytosquelette cortical (Cf. figure 60). En effet PIP2 inhibe la formation des MV mais la diminution de PIP2 augmente la vésiculation des plaquettes. Les autres phospholipides n'interfèrent pas avec la formation MV.

Les protéines contractiles jouent également un rôle dans la formation des MV. La protéine MLCK2 (myosin light chain kinase) active la myosine et permet ainsi la contraction à la base de la bulle (90) ; la myosine-1a (MYO1A) est également nécessaire pour la formation de MV (211). La protéine Rho lié au GTP active la kinase 1 associée à Rho (ROCK-1) conduisant à la phosphorylation des chaînes légères de la myosine. De même, ARF-6 (Adénosine diphosphate (ADP)-ribosylation factor 6, est une petite protéine de la famille de ras liant le GTP). ARF-6 régule l'activation de MLCK, l'activation de la myosine et contrôle le relargage des MV par les cellules de mélanome invasives (212).

Le mouvement induit par la contraction de la myosine permet le détachement de la membrane plasmique du cytosquelette, conduisant au relargage des MV dans le milieu extracellulaire, d'où le mécanisme de libération des MV par pincement.

Le bourgeonnement a lieu à des endroits spécifiques sur la membrane cellulaire qui sont enrichis en lipides et en protéines. Le cholestérol est un composant clé des rafts lipidiques, lesquels sont impliqués dans les événements initiaux de pincement. En effet, la déplétion pharmacologique de cholestérol cellulaire inhibe le bourgeonnement MV (196, 213, 214).

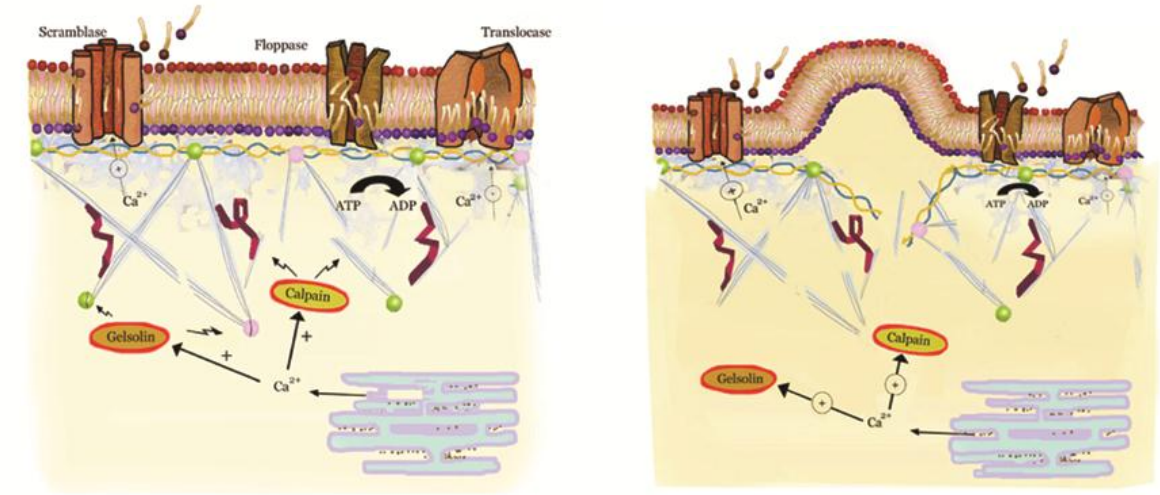


Figure 60 : Représentation du mécanisme de relargage des MV. *(Extrait de Piccin, Blood Rev, 2007) (209).*

II. Rôle des TMV dans le cancer :

Les TMV ont été détectées dans le sérum de patients atteints de différents types de cancers, comme les cancers des VADS (215-216).
Les MV circulantes présentent des marqueurs spécifiques tumoraux (Cf. tableau 13 et figure 58) et peuvent donc être utilisées pour le diagnostic précoce des cancers. En effet, la survie globale est réduite quand le nombre de MV est important ; le taux de MV est plus important dans les phases avancées de la maladie comparé aux stades moins avancés. Ainsi, les MV peuvent donc servir à la prédiction du stade de la maladie (206).

Longtemps considérées comme des artefacts, elles sont impliquées dans la communication de cellules à cellules. Le rôle principal des MV est le transfert d'information entre les cellules à partir desquelles elles sont issues et leur milieu environnant. Les MV circulent dans l'espace extracellulaire du site où elles ont été libérées mais en quelques minutes, elles peuvent bouger sur de longues distances par diffusion et peuvent apparaître dans les liquides biologiques tels que le fluide cérébrospinal, le sang et les urines.

Les interactions avec les cellules-cibles s'effectuent de manière spécifique par reconnaissance avec les molécules de surface (Cf. figure 61). Dans certains cas, la liaison est suivie de la capture par endocytose des MV ; celles-ci peuvent ensuite fusionner avec la membrane

d'endocytose et libérer leur contenu dans le cytosol (par transfert horizontal) ou alors elles peuvent fusionner avec les lysosomes ou encore être libérées dans l'espace extracellulaire après fusion de l'endosome avec la membrane plasmique (par transcytose).

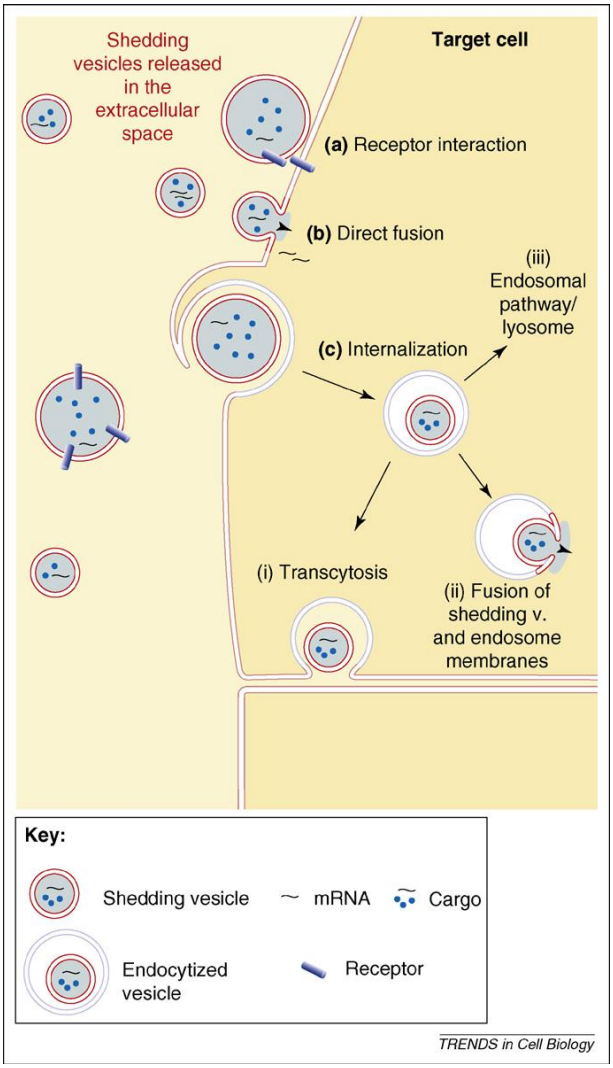


Figure 61. Schéma représentatif des différents mécanismes d'interaction des MV avec les cellules cibles. *(Extrait de Cocucci, Trends in cell biology, 2009) (208).*

Il a été montré que le transfert des MV aux cellules adjacentes ou à distance affecte les différentes étapes de la progression tumorale incluant l'angiogenèse, l'échappement de la surveillance immunitaire, la dégradation de la MEC, la formation des métastases, l'agressivité et la résistance aux drogues (Cf. figure 62).

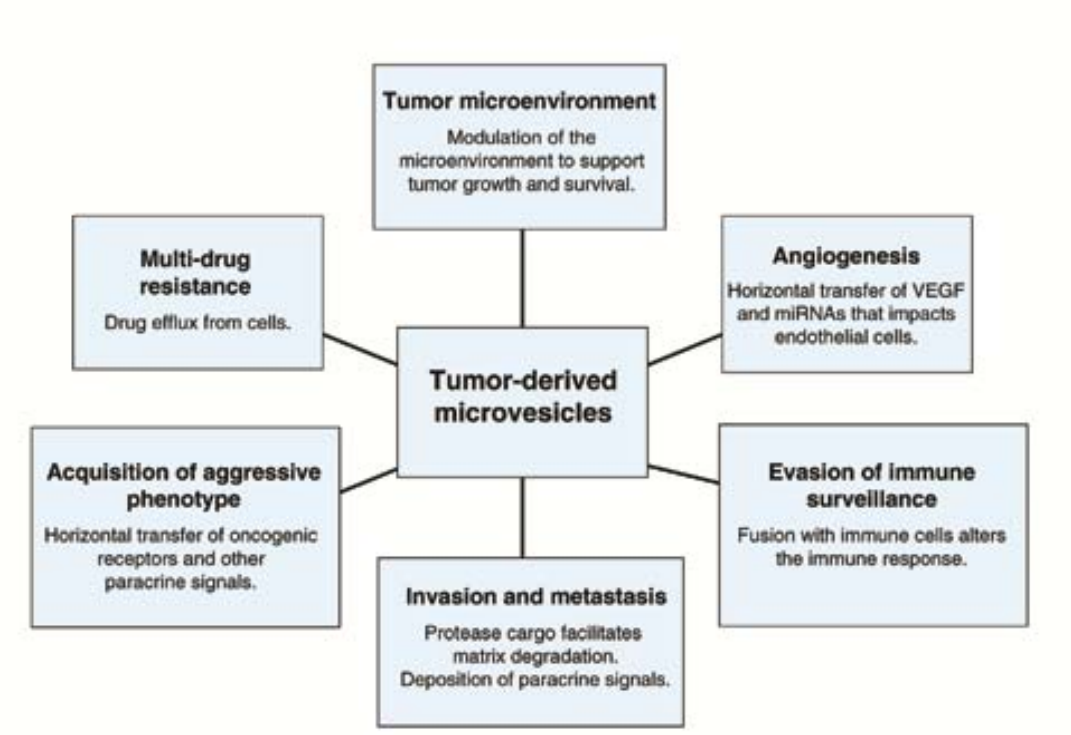


Figure 62 : Rôle des microvésicules dans la progression des cancers. *(Extrait de Muralidharan-Chari, J Cell Sci, 2010) (213).*

II.1. Le transfert d'information :

Al-Nedawi et al. ont montré que le récepteur oncogénique EGFRvIII trouvé exclusivement dans certaines tumeurs agressives de gliome peut être transféré à une population de cellules tumorales non agressives par les MV (217). Les cellules réceptrices présentent une activation des voies de signalisation de MAPK et d'Akt et un changement dans l'expression de certains gènes régulés par EGFRvIII (BEGF, Bcl-XL, p27). La morphologie de ces cellules est transformée et leur croissance est moins dépendante de l'accrochage. Le traitement des MV par un inhibiteur de kinase diminue la réponse des cellules réceptrices ; l'annexine V agit de la même manière en masquant des résidus PS exposés à la surface des MV.

De la même manière, il a été montré que les MV issues de cellules de mélanome de souris B16 (F10) étaient capables de fusionner avec les cellules de mélanome de souris faiblement métastatique B16 et les rendaient capables de métastaser dans les poumons.
Les MV de cellules tumorales peuvent affecter le phénotype et la fonction des macrophages sans nécessité d'un contact direct de cellule à cellule (200).

Ainsi, les TMV transportent des protéines membranaires ou cytosoliques et du matériel génétique qui peuvent être transmis aux cellules acceptrices à proximité ou à distance et peuvent ainsi modifier leurs phénotypes par induction des voies de signalisation cellulaire ou en induisant des changements dans la maturation et la différenciation des cellules cibles.

II.2. La survie :

II.2.a. Résistance aux médicaments :

Les cellules peuvent relarguer des MV pour se défendre contre un stress intracellulaire.
En effet, il a été montré que les cellules se protègent de l'apoptose en libérant des MV contenant la caspase-3. Lorsque l'on inhibe la libération des MV, la caspase-3 s'accumule dans le cytoplasme et les cellules entrent en apoptose. De plus, des cellules dénuées de caspase-3 ne relarguent pas ou peu de MV mais cette capacité peut être restaurée par transfection avec une caspase 3 fonctionnelle (206).

Il a été montré que les cellules cancéreuses résistantes à certaines chimiothérapies comme la doxorubicine (218) ou le cisplatine (219) relarguaient plus de MV que les cellules cancéreuses sensibles à ces traitements. Les TMV sont donc fortement impliquées dans le mécanisme d'efflux de médicaments, mécanisme impliqué dans la résistance aux drogues.

II.2.b. Echappement de la surveillance par le système immunitaire :

Les MV ont également un rôle dans la survie des cellules tumorales en permettant à des antigènes de surface spécifiques aux tumeurs d'être relargués et ainsi permettre d'éviter à ces cellules d'être reconnues par le système de défense immunitaire (220) ; les cellules tumorales deviennent alors invisibles.
L'activité pro-coagulante des TMV peut permettre également aux cellules tumorales de se couvrir de fibrine pour échapper à la détection et à l'attaque du système immunitaire.
De plus, il a été montré que les cellules tumorales participent ainsi à la diminution de la fonction de présentation de l'antigène et augmentent ainsi leur chance de survie (220). Les MV diminuent la capacité des monocytes circulant CD14+ de se différencier en cellules dendritiques fonctionnelles. Les microvésicules peuvent renforcer la croissance des cellules tumorales en dirigeant l'apoptose des lymphocytes T activés de manière Fas dépendant (220-

221). Les cellules NK (natural killer) ne sont pas épargnées : elles perdent leur potentiel cytolytique à travers la sous-régulation (downregulation) de l'expression de perforine après contact avec les TMV.

La présence de PS sur la face externe favorise la clairance des cellules apoptotiques et des fragments par les macrophages (222). Il a été montré que l'externalisation de PS au niveau des cellules tumorales se produit sans doute dans un effort pour réprimer une réponse immunitaire et promouvoir la survie des cellules tumorales (223). Les MV deviennent la cible pour le système immunitaire à la place des cellules tumorales.

Enfin, Sim et al ont montré que l'activation du complément déclenchait le relargage de MV plaquettaire. Ce relargage est impliqué dans le mécanisme de résistance au complément et peut être considéré comme un mécanisme de résistance contre un stress externe (224). De la même façon, les cellules cancéreuses peuvent inactiver les complexes du complément et échapper à la lyse en relarguant des MV (216, 225).

II.3. L'invasion et les métastases :

Les MV sont impliquées dans l'invasion et la formation des métastases par les protéines qu'elles exposent à leur surface. Ce sont généralement des enzymes capables de dégrader le tissu sous-jacent et qui permettent ainsi la migration des cellules tumorales. En effet, il a été montré que les MV relarguées par les cellules tumorales pouvaient porter des métalloprotéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (comme les MMP-2, MMP-9, MT1-MMP), de l'uPA qui transforme le plasminogène en plasmine et permettaient ainsi la dégradation de la fibrine retrouvée dans l'environnement tumoral. Les MV peuvent également exposer de l'EMMPRIN (CD147), inducteur des métalloprotéases matricielles. De plus, uPA est activé à un faible pH. Cet environnement acide est typiquement retrouvé au sein des tumeurs et facilite l'activation des MMP à l'intérieur des MV.

Il a été montré que le taux de vésicules déversé par les cellules tumorales est corrélé avec leur invasivité *in vitro* (226) et *in vivo* (227). L'inhibition des protéases et de l'adhésion des MV à la matrice extracellulaire suppriment la capacité des MV à promouvoir l'invasion de la tumeur (226). Les MV issues de personnes atteintes de maladies bénignes ont une faible activité

lytique alors que celles issues de personnes atteintes d'un cancer présentent des MMP actives. De même, la protéine ARF-6 (impliquée dans la régulation de l'invasion tumoral *in vitro* et *in vivo*) a été trouvée sur les MV issues de lignées cellulaires tumorales invasives (212).

II.4. La modification du microenvironnement :

La tumeur est composée d'un ensemble varié de cellules communicantes ; toutes les cellules à l'intérieur de la tumeur (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales, adipocytes) collaborent pour établir un environnement favorable au développement du cancer. Cet environnement est appelé microenvironnement.
Castellana et al. ont montré le mécanisme de communication croisée entre les cellules tumorales et les fibroblastes par l'intermédiaire des MV (228) : les MV relarguées par des cellules d'un cancer invasif de la prostate PC3 déclenchent la phosphorylation de ERK, la sur-régulation de MMP-9, l'augmentation de la mobilité et la résistance contre l'apoptose des fibroblastes dans le microenvironnement. Ainsi, les MV peuvent altérer les fonctions des fibroblastes normaux présents dans le stroma, en stimulant leur migration et le relargage de MV. A leur tour, les fibroblastes activés libèrent des MV pour faciliter la migration et l'invasion des cellules tumorales de la prostate. Les MV relarguées par les cellules du cancer du poumon peuvent également activer et attirer les fibroblastes du stroma ou les cellules endothéliales pour faciliter la croissance de la tumeur (229).

Le TF joue également un rôle dans l'élaboration du microenvironnement tumoral. Le pool de TF des cellules cancéreuse et de l'hôte a été lié à l'établissement d'une niche favorable pour le homing des cellules cancéreuses et leur prolifération (141).

II.5. La coagulation :

Les cellules impliquées dans la coagulation (comme les plaquettes et les CE) libèrent des MV permettant d'apporter une surface supplémentaire en aminophospholipides permettant de fournir un grand nombre de site de liaison pour les facteurs intervenant dans la coagulation sanguine comme le facteur IXa, VIII, Va et Iia (Cf partie 2 paragraphe I.4.a). Le facteur tissulaire (TF) présent à la surface des MV issues des monocytes joue également un rôle dans la coagulation sanguine (196). Le TF est exprimé sur les MV des monocytes au niveau des

rafts lipidiques riches en cholestérol et est associé à PSLG-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) (196). Ce complexe se lie aux plaquettes via les récepteurs CD62P pour amplifier la formation du thrombus intravasculaire (230).
Les MV jouent donc un rôle dans la coagulation en apportant le support phospholipidique et le TF nécessaire à l'initiation de la cascade.

A coté de ce rôle physiologique, les MV sont également impliquées dans de nombreuses maladies où la coagulation est perturbée. En effet, l'inhibition de la formation des MV conduit au syndrome hémorragique de Scott alors que l'augmentation de leur libération joue un rôle important dans l'état pro-coagulant observé dans de nombreuses maladies (infarctus du myocarde, syndrome antiphospholipide, polyarthrite rhumatoïde, thrombocytopénie induite par l'héparine (TIH)…).
De même, le cancer est généralement associé à un fort risque de thrombose, l'hypercoagulabilité étant la seconde cause de mort chez les patients cancéreux.

Le rôle critique de TF dans hémostase est sous le contrôle de son expression normalement limité aux cellules extravasculaires. Ainsi, le TF est séparé de son ligand (FVII(a)) tant que l'intégrité vasculaire est préservée.
Le TF est sur-régulé dans les cellules malignes et les cellules normales après stimulation. L'initiation de la coagulation peut être induite directement par le TF quand il est exprimé à la surface des cellules malignes ou induite de manière indirecte après l'expression de TF par les cellules endothéliales, les monocytes ou les macrophages stimulés lors de l'inflammation. De plus, à cause de l'hyperperméabilité vasculaire observée dans les tumeurs, les facteurs de coagulation, normalement séquestrés dans le compartiment vasculaire, peuvent diffuser à l'intérieur du stroma et initier le processus de coagulation (141).

Les PS exposées à la surface des MV propagent le processus de coagulation en facilitant l'assemblage et l'activation des complexes tenase et prothrombinase. De plus, PS est un cofacteur important pour l'activité du TF en lui donnant la surface indispensable chargé négativement pour promouvoir la génération de la thrombine.
Les propriétés procoagulantes des MV dérivées des cellules cancéreuses peuvent entretenir la formation de fibrine intravasculaire et facilite ainsi l'adhérence des cellules cancéreuses à la paroi du vaisseau (231).

II.6. L'angiogenèse :

Plusieurs études indiquent que les microvésicules dérivées de tumeurs stimulent la sécrétion de plusieurs facteurs pro-angiogéniques par les fibroblastes du stroma, attirent chimiquement et facilitent la prolifération des cellules endothéliales pour promouvoir l'angiogenèse et la croissance de la tumeur. Des effets angiogéniques ont également été induits par transfert horizontal d'ARNm et de miARN via les microvésicules libérées par des tumeurs et capturées par les cellules endothéliales (208,232).

Il a été montré que les facteurs pro-angiogéniques comme le FGF ou le VEGF augmentent la libération de microvésicules contenant des MMP par les cellules endothéliales et sont responsables de la dégradation de la matrice et favorisent l'angiogenèse. Les MMP-2 et MMP-9 ont également été trouvés sur les microvésicules tumorales issues de cancer du sein (233), de fibrosarcome (234), de cancer de l'ovaire (235). De même, l'intégrine-β1 (236) impliquées dans les interactions avec la matrice est retrouvée sur les TMV et l'hypoxie induit une augmentation du relargage des MV dans le cancer du poumon.

Le rôle des MV dans l'angiogenèse est complexe. En effet, un faible taux de MV stimule la formation de tubes endothéliaux *in vitro* alors qu'un fort taux a un effet inhibiteur sur la formation de tubes mais stimule l'invasion des HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) dans une matrice (194).

Les microvésicules tumorales peuvent activer les cellules endothéliales en leur délivrant des protéines comme EMMPRIN pouvant promouvoir la néo-angiogenèse (237), ou le facteur tissulaire (TF) ayant une activité pro-angiogénique et capable d'initier la transduction du signal et de contrôler l'expression de gènes comme le VEGF (238, 239).

Les lipides des MV (comme la sphingomyéline) sont également capables d'induire des activités pro-angiogéniques en agissant sur la migration des cellules endothéliales, l'invasion et la formation de tubes *in vitro* et la néovascularisation *in vivo* (240).

En résumé, les MV sont issues non seulement des cellules tumorales mais sont également libérées par les CE et les cellules du stroma. Ces MV participent activement à la progression des cancers (Cf. figure 63).

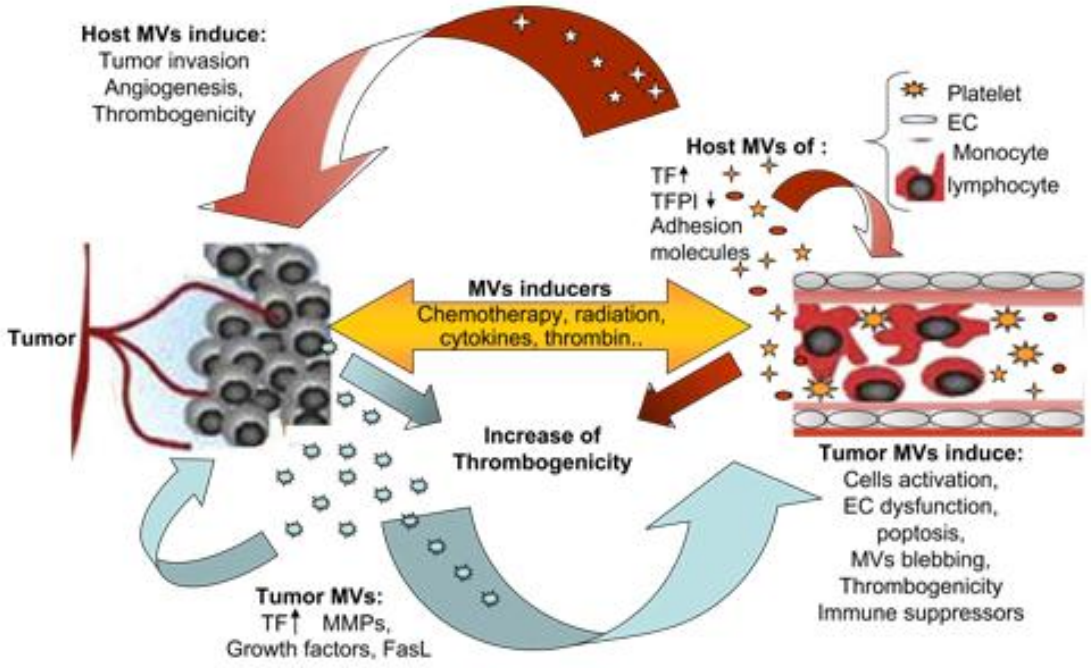


Figure 63 : Rôle des microvésicules dans le cancer *(Extrait d'Aharon, Best Practice & Research Clinical Haematology, 2009) (241).*

PARTIE EXPERIMENTALE

Partie 1 :

Matériel et méthodes

Toutes les manipulations de culture cellulaire ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire avec du matériel stérile et des milieux préchauffés à + 37°C. La culture des cellules est effectuée par incubation des boites dans un incubateur à CO_2 thermostaté à + 37°C contenant un mélange de gaz (5 % CO_2 et 95 % d'air) et 85 % d'humidité.
Des solutions bactéricides et fongicides sont utilisées pour nettoyer les consommables avant leur introduction sous la hotte ou pour nettoyer les appareils et éléments présent dans la pièce. Les effluents sont jetés en respectant les règles d'hygiène et sécurité en vigueur dans l'établissement.

I. Matériel

I.1. Les cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales ont été isolées selon la méthode de Jaffe modifiée (242) à partir de cordons ombilicaux obtenus après consentement des femmes arrivées à terme auprès de la maternité régionale de Nancy.

I.1.a. **Les réactifs :**

I.1.a.1. Le milieu de culture endothélial :

Le milieu servant à la culture des HUVEC est composé de :
Milieux synthétiques commerciaux M199 et RPMI-1640 (50%/50% v/v) (GibcoBRL, France)
+ 20 mM HEPES (Sigma, France)
+ 20 % de sérum humain AB (provenant de donneurs volontaires sains) décomplémenté
+ 2 mM de glutamine (GibcoBRL, France)
+ 100 U/mL de pénicilline (GibcoBRL, France)
+ 100 µg/mL de streptomycine (GibcoBRL, France)
+ 2,5 µg/mL de fungizone (GibcoBRL, France).
Conservation à + 4°C jusqu'à utilisation.

La décomplémentation est réalisé par incubation du sérum AB à + 56°C pendant 30 minutes et stérilisé par filtration (filtre de 0,22 µm de diamètre).

I.1.a.2. Le tampon de lavage HBSS :

La poudre commerciale d'HBSS (Hank's balanced salts solution, Sigma, France) est reconstitué selon les recommandations fournies par le fabriquant :

+ 0,35 g de $NaHCO_3$ (Sigma, France)

+ eau distillée qsp 1 L (pH 7,2).

La solution est stérilisée par filtration sur 0,22 µm et conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Ce tampon contient : KCl 0,4g/L ; NaCl 8,0g/L ; KH_2PO_4 0,06g/L ; Na_2HPO_4 0,04778 g/L ; D-glucose 1,0g/L et rouge de phénol 0,011g/L.

I.1.a.3. Les solutions de digestion (trypsinisation)

Le détachement des HUVEC de la veine ombilicale s'effectue avec une solution de trypsine-EDTA à 0,25 % (Sigma, France), soit 2,5 g de trypsine porcine et 0,2 g de EDTA-Na_4 dans 100 mL de HBSS.

Le détachement des HUVEC des supports de culture s'effectue avec une solution trypsine-EDTA à 0,125 % obtenue après dilution de la solution précédente au ½ avec du tampon HBSS.

La solution de gélatine (coating des supports de culture) est une solution de PBS contenant 1 % (p/v) de gélatine porcine (Sigma, France) et permet une meilleure adhérence des cellules au support de culture.

I.1.b. **L'isolement et la culture des CE :**

I.1.b.1. Le recueil des cordons

Les cordons sont recueillis dès l'expulsion placentaire. Ils sont coupés à une longueur d'environ de 20 à 25 cm et mis immédiatement dans un flacon de culture de 75 cm^2 contenant 150 mL de HBSS stérile. Placé rapidement à + 4°C, le cordon est utilisé le plus tôt possible et au maximum 6 heures après le prélèvement.

I.1.b.2. Le lavage de la veine ombilicale

Tout le travail d'isolement des HUVEC à partir des cordons ombilicaux s'effectue sous une hotte à flux laminaire à l'aide d'instruments stériles et des milieux préchauffés à + 37°C.

Le cordon est déposé dans une boite de culture stérile. L'extérieur du cordon est nettoyé avec de l'éthanol 70 %. Après dilatation de l'extrémité de la veine à l'aide d'une pince, un robinet

est inséré dans l'orifice de la veine et ligaturé fortement autour du cordon. A l'aide d'une seringue reliée au robinet, la veine est lavée trois fois avec du tampon HBSS pour éliminer le sang.

I.1.b.3. Le détachement des cellules (trypsinisation)

A l'aide de la seringue, la veine est remplie avec un peu de la solution de digestion.
Dès que la solution s'écoule de la veine, la deuxième extrémité du cordon est fermée avec une pince de chirurgien. Puis la solution de digestion continue d'être injectée jusqu'à ce que la veine soit bien gonflée (15-20 mL final).
Le cordon est ensuite immergé dans du tampon HBSS et placé au bain-marie pendant 10 min à + 37°C. Le cordon est alors retiré, posé sur une boîte de pétri, massé doucement quelques secondes. L'extrémité fermée par la pince est coupée et la solution de digestion est recueillie dans un tube plastique de 50 mL contenant 1 mL de sérum AB humain pour arrêter l'action de la trypsine.
La veine est lavée trois fois avec 10 mL de tampon HBSS. La suspension cellulaire est centrifugée à 300 g pendant 6 minutes à température ambiante.
Après centrifugation, le surnageant est jeté et les cellules sont lavées avec 10 mL de milieu de culture.
Après la deuxième centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu de culture. Les cellules sont ensemencées dans une flasque de culture de 25 cm^2, puis placées dans l'incubateur à + 37°C.

I.1.b.4. Evolution de la culture

Dès le lendemain, les globules rouges restant sont éliminés en faisant subir à la boîte de culture quelques mouvements oscillatoires et le surnageant de culture est jeté.
Les cellules sont lavées deux fois de la même manière avec du tampon HBSS. Elles sont ensuite remises dans l'incubateur avec 5 mL de milieu de culture endothélial.
L'examen au microscope inversé à contraste de phase montre que la plupart des cellules ont adhérées au fond de la boîte, sous forme de nombreux îlots de cellules endothéliales. Cette culture correspond au passage zéro (P0).
Normalement après 5-7 jours de culture, les cellules sont confluentes, leur croissance s'arrête par inhibition de contact.

I.1.b.5. Passage en subcultures

A confluence, les cellules sont lavées 2 fois avec 5 mL de tampon HBSS. Les cellules sont détachées en laissant agir pendant 2 minutes à + 37°C 1,5 mL de trypsine-EDTA 0,125 %.
La digestion est arrêtée par addition de 5 mL de milieu de culture.
La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 350 g pendant 5 minutes. Après avoir été lavées, les cellules sont remises en suspension dans 15 mL de milieu de culture et ensemencées dans une flasque 75 cm^2, préalablement coatée avec la solution de gélatine, et correspond au premier passage (P1).
Après leur deuxième passage (P2), les cellules peuvent alors être ensemencées aux densités cellulaires nécessaires à l'expérience que l'on doit réaliser.
Les cellules ont été utilisées au maximum jusqu'au 5ième passage.

I.2. Les lignées cellulaires tumorales :

Les lignées cellulaires utilisées pour ces travaux sont issues de carcinomes épidermoïdes de la cavité buccale fournies par le Centre Alexis Vautrin (CAV, Nancy, France). Les cellules Cal 27 (CRL-2095, ATCC) proviennent d'un carcinome épidermoïde de la langue et les cellules FaDu (HTB-43, ATCC) d'un carcinome de l'hypopharynx. Les cellules sont conservées congelées dans l'azote liquide à - 180°C.

I.2.a. Les réactifs :

I.2.a.1. Le milieu de culture

Le milieu servant à la culture des lignées est composé de :
Milieux commerciaux RMPI-1640 sans rouge de phénol (GibcoBRL, France)
+ 10 % de sérum veau fœtal décomplémenté (SVF, Dutscher, France)
+ 2 mM de glutamine (GibcoBRL, France)
+ 100 U/mL de pénicilline (GibcoBRL, France)
+ 100 µg/mL de streptomycine (GibcoBRL, France)
Conservation à + 4°C jusqu'à utilisation.
La décomplémentation est réalisé par incubation du SVF à + 56°C pendant 30 minutes.

I.2.a.2. Les autres réactifs utilisés

PBS (sans Ca, sans Mg) (Sigma-Aldrich, France)

Solution de digestion : trypsine-EDTA 1X

Milieu de congélation : Cell culture freezing medium DMSO (GibcoBRL, France)

Isopropanol (VWR, France).

I.2.b. La culture des lignées tumorales :

I.2.b.1. La décongélation des cellules

Les cellules sont rapidement décongelées et mélangées à 10 mL de milieu de culture.

Après centrifugation à 300 g pendant 10 minutes, le culot est resuspendu dans 15 mL de milieu de culture et ensemencé dans une flasque de 75 cm^2. La boite de culture est placée dans l'incubateur (+ 37°C, 5 % CO_2) jusqu'à atteindre 80 % de confluence.

I.2.b.2. Le passage en subcultures (trypsinisation)

Les boites de culture des cellules à sub-confluence sont lavées 1 fois avec 10 mL de tampon PBS préchauffé à + 37°C. Les cellules sont ensuite détachées en laissant agir pendant 3 minutes à + 37°C 3 mL de trypsine-EDTA 1X. La digestion enzymatique est arrêtée par addition de 10 mL de milieu de culture. La suspension cellulaire est recueillie dans des tubes coniques stériles, puis centrifugée à 300 g pendant 10 minutes. Après avoir été lavées, les cellules sont remises en suspension dans 10 mL de milieu de culture et dénombrées. Les cellules sont ensemencées à 4000 cellules/cm^2 pour la continuité de la culture et/ou ensemencées selon le protocole utilisé. Les boites alors sont placées dans l'incubateur.

Les cellules Cal27 ont été utilisées entre les passages 10 et 35 ; les cellules FaDu entre les passages 65 et 90.

I.2.b.3. La congélation des cellules

Les cellules sont détachées selon le protocole indiqué au paragraphe I.2.b.2.

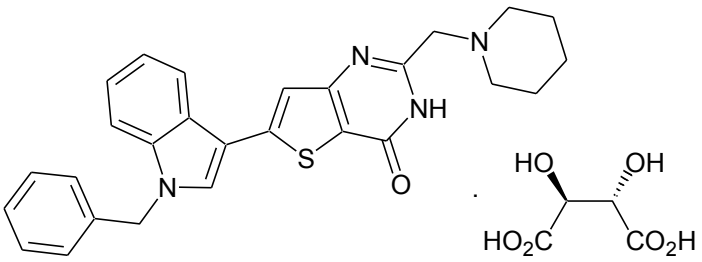
La suspension cellulaire est dénombrée et X x 10^6 cellules sont mis à centrifuger à 300 g pendant 10 minutes dans un tube conique. Le culot est suspendu avec X x 1mL de milieu de congélation. Des aliquotes de 1 mL sont rapidement transférés dans les cryotubes clairement identifiés (date, lignée, nombre de passage, initiales). Les tubes sont très vite placés dans la boite à congélation contenant de l'isopropanol et mis rapidement à congeler à - 80°C. Une fois congelé, les tubes sont transférés dans l'azote liquide (- 180°C).

I.3. Les molécules thérapeutiques utilisées

I.3.a. Les molécules anti-angiogéniques :

Les molécules anti-VEGFR-2 ont été synthétisées par le Dr M. Enrico Perspicace dans le cadre de sa thèse réalisé au laboratoire d'ingénierie moléculaire et biochimie pharmacologique (LIMBP) de l'université Paul Verlaine de Metz et soutenue publiquement le 5 octobre 2010. Ce sont des petites molécules pouvant s'insérer dans la poche de liaison à l'ATP du domaine tyrosine kinase du récepteur et empêche la phosphorylation et donc l'activation du récepteur.

Plusieurs molécules ont été synthétisées mais seul le tartrate de thiénopyrimidinone (EPS4) est soluble dans les milieux physiologiques ; voici sa formule chimique :



$C_{31}H_{32}N_4O_7S$

PM : 604,67 Da

Figure 64 : Structure du tartrate de thiénopyrimidinone (EPS4).

Afin que les facteurs de croissance présents dans le sérum n'interfèrent pas avec les expériences, les molécules ont été diluées dans du milieu de culture appauvri en sérum (2 % SVF). L'effet du médicament en présence du ligand a également été testé en présence de 10 ng/mL de VEGF-165 recombinant humain (R&D Systems Europe, France).

I.3.b. Les molécules anti-tumorales :

Les anti-EGFR étudiés sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur et possèdent une affinité plus forte que le ligand naturel du récepteur (EGF). Ainsi, ils empêchent la fixation du ligand et l'activation subséquente du récepteur.

Le cetuximab (C225, Erbitux®) (Merck Serono, France) est utilisé à partir de solutions injectables à 5 mg/mL. Le panitumumab (Vectibix®, Amgen S.A.S, France) est utilisé à partir de solutions injectables à 20 mg/mL.

Afin que les facteurs de croissance présents dans le sérum n'interfèrent pas avec les expériences, les médicaments ont été dilués dans du milieu de culture appauvri en sérum (2 % SVF).

Certains essais ont été réalisés en présence d'EGF recombinant humain (Roche Applied Science, Meylan, France) aux concentrations indiquées dans les expériences correspondantes.

II. Méthodes

II.1. La numération cellulaire :

II.1.a. Principe :

Cette technique permet de déterminer la quantité de cellules viables contenues dans une suspension à l'aide d'un hématimètre (Cf. figure 65). L'hématimètre (cellule de Malassez ou de Thoma) est une chambre de mesure quadrillée dont le volume est calibré (1 mm^3 et 0,1 mm^3 respectivement).

La numération est réalisée après ajout d'un colorant vital, le bleu trypan, exclu par les cellules viables mais pouvant rentrer dans les cellules mortes et les colore ainsi en bleu.

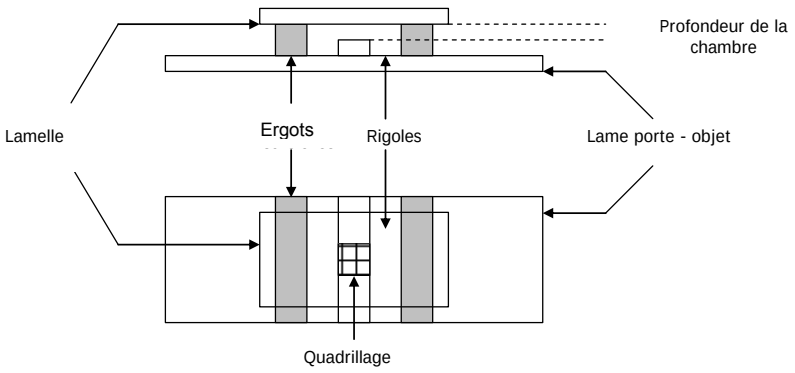


Figure 65 : Représentation d'un hématimètre.

II.1.b. Réactifs :

Chambre de Malassez et Thoma (VWR, France).

Bleu trypan (Sigmal-Aldrich, France)

II.1.c. Protocole :

Fixer la lamelle sur l'hématimètre après avoir humecté les ergots. S'assurer qu'elle ne bouge plus.

Dans un microtube, mélanger 450 µL de la suspension cellulaire avec 50 µL d'une solution de bleu trypan. Bien homogénéiser.

Déposer un peu de suspension cellulaire dans la chambre en posant le bout de la pipette sur la partie centrale transparente, contre le bord de la lamelle et remplir toute la chambre (la suspension doit légèrement déborder).

Compter le nombre de cellules viables contenu dans la chambre et effectuer les calculs.

Nombre de cellules / ml de solution =

Nombre de cellules dans toute la chambre * dilution * (1/volume de la chambre) * 1000

II.2. Les milieux conditionnés :

II.2.a. Principe :

Les milieux conditionnés sont des milieux issus de la culture des cellules. Ils contiennent tous les facteurs libérés par les cellules pendant un temps de culture déterminé mais sont appauvris en certaines substances utilisées par les cellules pendant la culture comme le glucose ou certains facteurs de croissance.

Cette technique nous permet de récupérer les différents facteurs libérés par les cellules tumorales exposées ou non à un traitement. L'effet indirect de ces traitements pourra par la suite être évalué par des techniques spécifiques après incubation des cellules endothéliales avec ces différents milieux conditionnés.

II.2.b. Réactifs :

Le milieu appauvri en sérum (2 % SVF) est un milieu commercial RMPI-1640 sans rouge de phénol (GibcoBRL, France) avec :

+ 2 % de SVF décomplémenté (Dutscher, France)
+ 2 mM de glutamine (GibcoBRL, France)
+ 100 U/mL de pénicilline (GibcoBRL, France)
+ 100 µg/mL de streptomycine (GibcoBRL, France)

Conservation à +4°C jusqu'à utilisation.

II.2.c. Méthode de préparation :

1) Les cellules tumorales sont détachées de leur support de culture par trypsinisation classique (Cf. paragraphe I.2.b.2).
2) Après numération, les cellules sont ensemencées à 10000 et 8000 cellules /cm^2 pour les Cal27 et FaDu respectivement dans des flasques 75 cm^2.
3) Les cellules sont cultivées pendant 3 jours jusqu'à atteindre 50 % de confluence.
4) Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec PBS.
5) 15 mL de milieu 2 % SVF contenant ou pas la molécule à tester à la concentration désirée sont déposés dans les boites de culture. En parallèle, des boites ne contenant pas de cellule sont également préparées et traitées dans les mêmes conditions afin d'obtenir les contrôles négatifs, c'est-à-dire des milieux contrôles non conditionnés.
6) Après 48 heures de culture, les milieux de culture sont transférés dans des tubes coniques stériles et centrifugés à 300 g pendant 10 minutes à + 20°C.
7) Les milieux conditionnés ainsi prélevés sont ensuite aliquotés et congelés à - 20°C jusqu'à leur utilisation (durée de conservation 3 mois maximum).

II.2.d. Caractérisation des facteurs pro- et anti-angiogéniques :

II.2.d.1. Human Angiogenesis Array

Principe :

L'array protéique est une technique d'analyse rapide et semi-quantitative de l'expression des protéines reposant sur le principe de l'Elisa sur membrane et couplée à une technique de détection par chimiluminescence. Des anticorps spécifiques reconnaissant 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse (Cf. tableau 15) ont été fixées sur une membrane de nitrocellulose sous forme de spot, en duplicat par le fabriquant. L'échantillon est mélangé avec les anticorps de détection et déposé sur la membrane. Après quelques lavages pour éliminer les protéines non liées, la streptavidine-HRP (horseradish peroxidase) et les réactifs de détection par chimiluminescence sont ajoutés. La lumière est émise par chaque spot et est proportionnelle au taux de protéines liées. Trois contrôles positifs et un contrôle négatif sont également répartis sur la membrane afin de tenir compte des liaisons non spécifiques.

Position	Cible	Position	Cible	Position	Cible
A1, A2	Positive Control (+)	B21, B22	FGF-4	D13, D14	PDGF-AA
A5, A6	Activin A	B23, B24	FGF-7 (KGF)	D15, D16	PDGF-AB/PDGF-BB
A7, A8	ADAMTS-1	C1, C2	GDNF	D17, D18	Persephin
A9, A10	Angiogenin (ANG)	C3, C4	GM-CSF	D19, D20	Platelet Factor 4 (PF4) (CXCL4)
A11, A12	Angiopoietin-1 (Ang-1)	C5, C6	HB-EGF	D21, D22	P*l*GF
A13, A14	Angiopoietin-2 (Ang-2)	C7, C8	HGF	D23, D24	Prolactin
A15, A16	Angiostatin/Plasminogen	C9, C10	IGFBP-1	E1, E2	Serpin B5 (Maspin)
A17, A18	Amphiregulin (AR)	C11, C12	IGFBP-2	E3, E4	Serpin E1 (PAI-1)
A19, A20	Artemin	C13, C14	IGFBP-3	E5, E6	Serpin F1 (PEDF)
A23, A24	Positive Control (+)	C15, C16	IL-1β (IL-1F2)	E7, E8	TIMP-1
B1, B2	Coagulation Factor III (TF)	C17, C18	IL-8 (CXCL8)	E9, E10	TIMP-4
B3, B4	CXCL16	C19, C20	LAP (TGFβ-1)	E11, E12	Thrombospondin-1 (TSP-1)
B5, B6	DPPIV (CD26)	C21, C22	Leptin	E13, E14	Thrombospondin-2 (TSP-2)
B7, B8	EGF	C23, C24	MCP-1 (CCL-2)	E15, E16	uPA
B9, B10	EG-VEGF PK1	D1, D2	MIP-1 CCL3	E17, E18	Vasohibin
B11, B12	Endoglin (CD105)	D3, D4	MMP-8	E19, E20	VEGF
B13, B14	Endostatin/Collagen XVIII	D5, D6	MMP-9	E21, E22	VEGF-C
B15, B16	Endothelin-1 (ET-1)	D7, D8	NRG1-β1 (HRG1 -β1)	F1, F2	Positive Control (+)
B17, B18	FGF acidic (FGF-1)	D9, D10	Pentraxin 3 (PTX3) (TSG-14)	F23, F24	Negative Control (-)
B19, B20	FGF basic (FGF-2)	D11, D12	PD-ECGF		

Tableau 15 : Liste des cytokines détectées par le kit « Proteome Profiler™ Array ».

Réactifs :

Dosage des protéines par la méthode BCA (Bicinchoninic acid) : BCA® protein assay kit (Thermo scientific, France)

Human Angiogenesis Array Kit : Proteome Profiler® Array assay (ARY007, R&D Systems, France) : les différents réactifs du kit sont reconstitués avec de l'eau distillée 15MΩ.

Réactifs de révélation par chimiluminescence :

- SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific, France).
- Immun-Star® WesternCTM Chemiluminescent kit (BioRad, France).

Analyseur d'image : Chemidoc® XRS (BioRad, France) + logiciel d'analyse d'image Quantity One (BioRad, France)

Protocole :

1) Le dosage du contenu total en protéines dans les milieux conditionnés a été réalisé selon le principe de la méthode de Lowry (kit BCA) conformément aux recommandations fournies par le fabriquant.

2) Le kit « Proteome Profiler® Array » a été utilisé conformément aux recommandations faites par le fabriquant. Les réactifs du kit ont été placés 30 minutes à température ambiante avant d'être utilisés.

3) Les sites de liaison non spécifique de la membrane de nitrocellulose ont été bloqués pendant 1 heure sous agitation à température ambiante avec le tampon fourni par le kit.

4) 900 µg/mL de protéines ont été mélangés dans un microtube avec 500 µL de tampon de dilution et 15 µL d'anticorps de détection biotinylés et laissé incubé pendant 1 heure à température ambiante.

5) Le mélange échantillon/anticorps de détection est déposé sur la membrane et laissé à incuber pendant une nuit à + 4°C après élimination de la solution de blocage.

6) Trois lavages sont réalisés avec le tampon de lavage fourni dans le kit.

7) 1,5 mL de streptavidine-HRP sont déposés dans le fond de la boite. La membrane est égouttée puis retournée sur la solution de streptavidine et incubée pendant 30 minutes à température ambiante.

8) Trois lavages sont réalisés avec le tampon de lavage fourni dans le kit.

9) La détection de la chimiluminescence est réalisée selon les recommandations fournies par le fabriquant) : les membranes sont égouttées et déposées sur le plateau de l'analyseur d'image. 450 µL de solution de révélation (X mL de tampon péroxide + X mL de luminol) sont déposés sur chaque membrane.

Après avoir effectué la mise au point, les spots sont révélés par une illumination de 10 minutes.

10) Le niveau de gris est déterminé pour chaque spot et le niveau du bruit de fond est soustrait à cette valeur. Le seuil de détection limite a été fixé à trois fois le niveau du bruit de fond. Les

protéines détectées sont identifiées à l'aide d'un film transparent représentant les coordonnées de chaque spot (Cf. figure 66 ci-dessous).

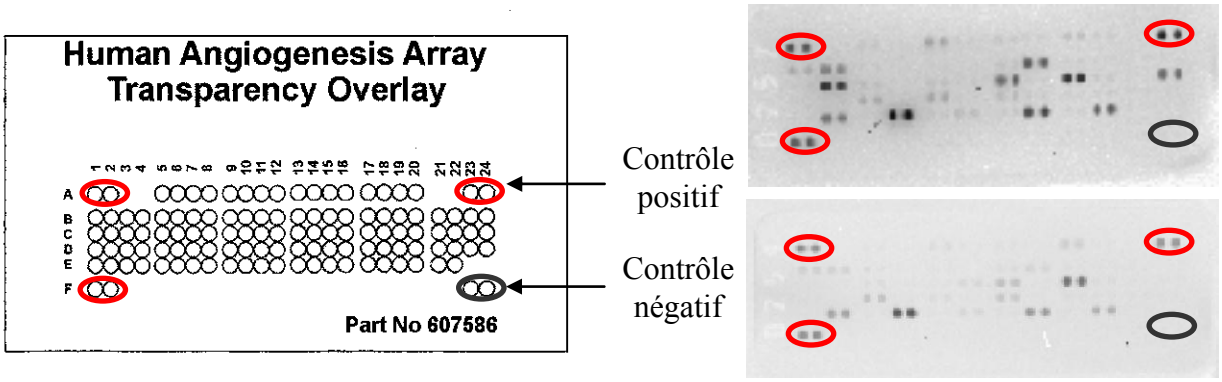


Figure 66 : Méthode de détection des protéines sur une membrane du kit « Proteome Profiler® Array » : film transparent servant à identifier les protéines détectées (à gauche), exemple de membrane obtenue après incubation avec les milieux conditionnés issus des Cal27 (à droite, au dessus) et FaDu (à droite, au dessous). Les contrôles positifs sont entourés en rouge et les contrôles négatifs en noir.

II.2.d.2. Bioplex® protein array :

Principe :

Le Bioplex protein array (BPA) est une technique d'analyse de l'expression des protéines semiquantitative qui repose sur le principe de l'ELISA sur billes, couplée à la technique de détection de la cytométrie en flux (243). Développé par Luminex (Oosterhout, Pays-Bas), ce principe de détection des protéines permet l'analyse simultanée de nombreuses protéines cibles (jusqu'à 100 théoriquement) sur des échantillons de quantité très réduite. L'anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt est couplé de façon covalente à une bille marquée par un fluorophore. Chaque bille a donc sa signature spectrale propre. Suite à l'incubation de l'échantillon avec le mélange contenant les billes, un anticorps biotinylé dirigé contre un épitope différent de la protéine est ajouté, réagissant avec la streptavidine-phycoérythrine (PE). Ce système de « sandwich » permet une double détection : un laser excitant la fluorescence de la bille (635 nm) et l'autre excitant le complexe streptavidine-PE (532 nm). La fluorescence de la bille couplée à l'anticorps assure l'identité de la cible, l'intensité de fluorescence de la streptavidine-PE permet la quantification.

Réactifs utilisés :

Dosage des protéines par la méthode BCA (Bicinchoninic acid) : BCA® protein assay kit (Thermo scientific, France)

Kit de détection BioPlex™ :

- Bio-Plex Cytokine Reagent Kit (BioRad, France) : solution de lavage, streptavidine-PE.
- Bio-Plex Human Basic FGF Assay
- Bio-Plex™ Human VEGF Assay.

Protocole :

1) Le dosage du contenu total en protéines dans les milieux conditionnés a été réalisé selon le principe de la méthode de Lowry (kit BCA) conformément aux recommandations fournies par le fabriquant.

2) 6 µg de protéines (échantillon ou gamme de concentration) sont déposés dans les puits d'une plaques 96 puits et diluées dans une solution tamponnée présente dans le kit.

3) Ajouter les billes couplées aux anticorps spécifiques (anti-VEGF, anti-FGF-2) et laisser à incuber pendant 1 nuit à + 20°C.

3) Après un rinçage, les plaques sont incubées avec la solution d'anticorps biotinylés pendant 30 minutes à température ambiante sous agitation.

4) La solution de révélation contenant le complexe streptavidine-PE est ajouté et mis en contact 10 minutes.

5) L'analyse consiste ensuite à une double excitation fluorescente permettant de recueillir le signal de la bille et de quantifier la protéine cible via l'intensité de fluorescence de la phycoérythrine. Le logiciel calcule la concentration en cytokine à partir d'une courbe standard obtenue avec une solution étalon.

II.3. Etude de la viabilité des cellules :

II.3.a. A travers l'activité métabolique global (test MTT)

II.3.a.1. Principe :

Cette technique permet la mesure spectrophotométrique de la croissance cellulaire en fonction de l'activité mitochondriale des cellules vivantes.

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2yl)-2,5 diphényltétrazolium) est un sel de tétrazolium hydrosoluble de couleur jaune qui est réduit en un cristal insoluble pourpre (formazan) par les succinates déshydrogénases mitochondriales (NADH+ dépendante). Cette conversion n'est effectuée que par les cellules ayant une activité métabolique mitochondriale, c'est-à-dire par les cellules viables.

Le métabolisme des cellules en prolifération est plus important que celui des cellules quiescentes ou non actives. La mesure spectrophotométrique de la quantité des cristaux de formazan formé pendant un temps donné permettra d'évaluer une éventuelle cytotoxicité des différents milieux utilisés lors de la culture (dilution de médicaments ou milieux conditionnés) par rapport aux milieux contrôle (sans le médicament ou non conditionnés).

II.3.a.2. Réactifs et matériels :

RMPI (GibcoBRL, France)

MTT : 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide ; blue Thiazolyl (Sigma, France) à 2 mg/mL dans RMPI

DMSO (dimethylsulfoxide, Fisher Scientific, France)

Spectrophotomètre : EL800 Universal microplate reader (Bio-Tek instrument, USA).

II.3.a.3. Protocole :

1) Les cellules sont ensemencées à une densité de 2 x 10^4 cellules/cm^2 dans des plaques de 24 puits et cultivées pendant 24 heures.

2) Le milieu de culture est ensuite remplacé par 500 µL des différents milieux conditionnés ou des dilutions de médicaments.

3) Après incubation pendant 24 ou 48 heures, le surnageant de culture est remplacé par 500 µL d'une solution de MTT préparée extemporanément à 0,4 µg/mL et mis à incuber pendant 2 ou 3 heures à + 37°C pour les lignées et les cellules endothéliales respectivement.

4) Les cristaux pourpres de formazan sont dissous avec 400 µL de DMSO.

5) Après avoir bien mélangé par agitation rotative, 100 µL de surnageant sont transférés dans les puits d'une plaque de 96 puits.

6) L'absorbance est mesurée à la longueur d'onde de mesure de 570 nm ; la valeur d'absorbance obtenue à la longueur d'onde de référence de 630 nm pour le même puits est soustraite de cette valeur. Le graph Absorbance = f(expérience) est tracé.

Ainsi, une diminution de la formation du formazan peut être observée lorsqu'une molécule présente dans le milieu de culture des cellules diminue l'activité de la succinate déshydrogénases. Cependant, cette diminution de la formation du formazan peut également être observée lorsque le nombre de cellule diminue. Le nombre de cellules présentes dans un échantillon peut être évalué par numération après avoir détaché les cellules de leur support. Mais cette technique devient vite laborieuse lorsque l'on a de nombreuses conditions, sans compter le risque de perdre des cellules quand on travaille en plaque multipuits. Nous avons préféré utilisé une méthode de quantification de l'ADN, la méthode au Hoechst.

II.3.b. **A travers la quantification de l'ADN total (Hoechst) :**

II.3.b.1. Principe :

Le Hoechst 33258 est un colorant vital fluorescent se liant préférentiellement aux bases AT de l'ADN. Une fois lié à l'ADN, la longueur d'onde d'émission de cet agent change ce qui permet la mesure de la quantité d'ADN totale par fluorimétrie après lyse des cellules. Les cellules en culture contiennent globalement la même quantité d'ADN lorsque l'on ne considère qu'un seul type cellulaire. Ainsi, la quantité de Hoechst incorporé dans l'ADN est quasiment proportionnel au nombre de cellules présentes dans l'échantillon. Il permet ainsi de quantifier précisément le nombre de cellules par mesure de la fluorescence émise par le composé lié à l'aide d'une gamme étalon (réalisée avec une gamme de cellules).

Ainsi, le résultat de ces deux tests (MTT et Hoechst) nous permet de déterminer si les agents thérapeutiques utilisés sont plutôt cytostatiques (diminution de l'activité métabolique sans affecter le nombre de cellules) ou plutôt cytotoxiques (diminution de l'activité métabolique et du nombre de cellules).

II.3.b.2. Réactifs et matériels :

Solution mère de Hoechst 33258 (Sigma, France) : 10 mg/mL dans de l'eau distillée et congelé à - 20°C jusqu'à utilisation.

Solution de travail (WS) de Hoechst : 100 µg/mL (dilution solution mère dans le tampon TNE)

Eau distillée 15 MΩ

Tampon TNE : 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 2 M NaCl pH 7,5

Spatule inox

Plaque 96 puits pour fluorescence

Lecteur microplaque de fluorescence : Twinkle LB970 (Berthold, France)

II.3.b.3. Protocole :

1) Les cellules sont ensemencées à une densité de 2 x 10^4 cellules/cm^2 dans des plaques de 24 puits et cultivée pendant 24 heures.

2) Le milieu de culture est ensuite remplacé par 500 µL des différents milieux conditionnés ou des dilutions de médicaments.

3) Après 24 ou 48 heures d'incubation, le milieu de culture est éliminé et la plaque multipuits est retournée sur du papier absorbant pendant 1 min puis mise à congeler à - 80°C.

4) Les cellules sont lysées une première fois par addition de 250 µL d'eau distillée stérile dans chaque puits et laissé sous agitation rotative à plat pendant 1 heure à T. Amb.

5) La plaque est ensuite remise à congeler à - 80°C.

6) La lyse cellulaire est complétée en laissant la plaque se réchauffer à T. Amb pendant 1 heure sous agitation rotative, suivi d'un grattage des puits avec l'extrémité plat d'une spatule en inox.

7) Dans les puits d'une plaque noire, déposer 100 µL de lysat cellulaire et 100 µL de WS. Le blanc est obtenu en remplaçant le lysat par de l'eau distillée stérile.

8) La fluorescence est mesurée par le lecteur de microplaque à fluorescence aux longueurs d'excitation et d'émission de 360 et 460 nm respectivement.

II.3.b.4. Vérification de la linéarité de la méthode :

Cette expérimentation a été réalisée pour savoir si cette méthode de dosage est linéaire avec le nombre de cellule utilisé lors des expérimentations. Les temps de doublement des cellules étant d'environ 24 heures, le nombre de cellules présent dans les puits au bout des 3 jours de culture se situe approximativement aux alentours de 120000 cellules par puits (pour une densité d'ensemencement 30000 cellules/puits).

Une gamme étalon de différentes densités de cellules a été réalisée :

Après avoir décollé les cellules de leur support et effectué une numération de la suspension cellulaire, une série de dilution a été effectuée pour obtenir la gamme étalon de cellule.

0,5 mL de chaque point de la gamme (0 à 200000 cellules/mL) sont déposés dans les puits d'une plaque de 24 puits en triplicat et laissé adhérés 24 heures à + 37°C dans l'incubateur à CO_2.
La mesure de la viabilité est ensuite réalisée selon le protocole indiqué ci-dessus.

Les graphiques représentant le nombre de cellules/puits en fonction de l'intensité de fluorescence obtenue ([nombre de cellules] = f (Unité relative de fluo)) sont donnés dans la figure 67 pour les lignées Cal27 et FaDu et la figure 68 pour les cellules endothéliales.
Les résultats montrent une relation linéaire entre ces deux paramètres avec un coefficient de corrélation supérieur à 0,9.
Enfin, afin de minimiser les variations dues au changement de réactif, chaque série d'expérimentation a été analysée avec la même solution de travail (WS Hoechst).

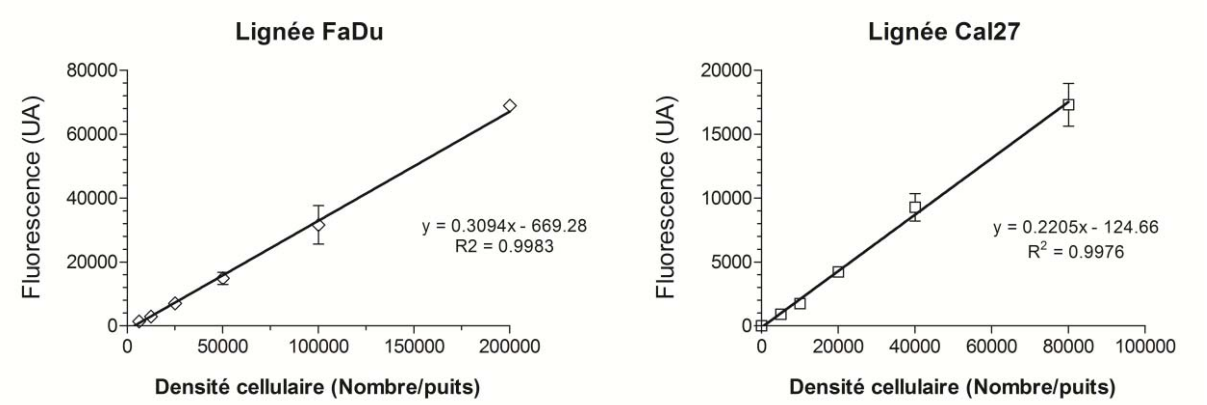


Figure 67 : Vérification de la linéarité de la technique de mesure de la viabilité (Hoechst) par l'utilisation de gamme étalon des lignées cellulaire Cal27 (à gauche, N=4 triplicat) et FaDu (à droite, N=2 triplicat).

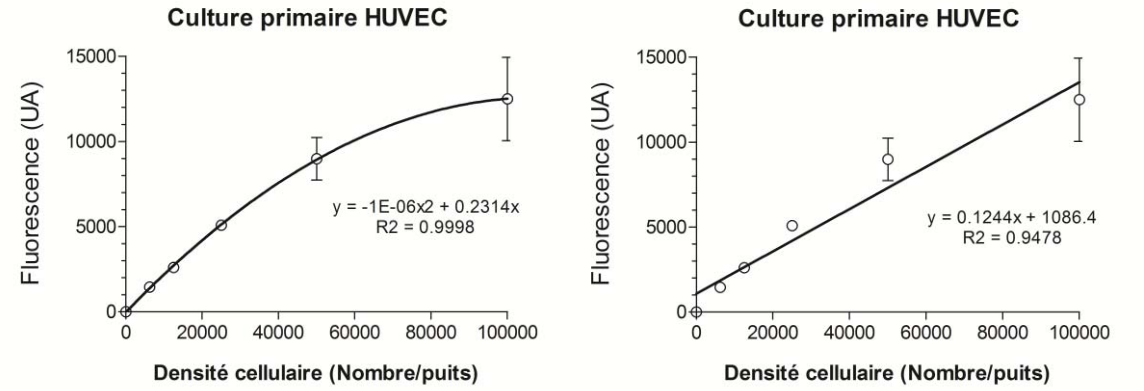


Figure 68 : Vérification de la linéarité de la technique de la mesure de la viabilité (Hoechst) par l'utilisation de gamme étalon des cellules endothéliales HUVEC (N=4, triplicat).

Même si les résultats obtenus avec les HUVEC sont mieux extrapolés avec une courbe de régression polynomiale, ces essais ont été réalisés en diluant les cellules dans le milieu endothélial complet. Or, lors de nos expérimentations, nous utilisons du milieu appauvri en sérum et les HUVEC prolifèrent moins vite dans ce milieu.

Par conséquent, le test de viabilité effectué varie bien linéairement en fonction du nombre de cellule dans nos conditions expérimentales. Nous pouvons donc l'utiliser pour évaluer la viabilité des cellules après incubation avec la molécule ou le milieu à tester.

II.3.b.5. Calcul du temps de doublement des cellules :

Cette technique nous a permis de calculer les temps de doublement des différents types cellulaire étudié à partir des courbes de croissance obtenues.

Les cellules ont été ensemencées à 20000 cellules/cm^2 dans leur milieu de culture et cultivées pendant 7 jours. La viabilité a été mesurée au bout de 1, 3 et 7 jours de culture. Le nombre de cellule/puits a été calculé à partir d'une gamme étalon de cellule. La courbe de croissance (nombre de cellule en fonction du temps) est tracée (Cf. figure 69).

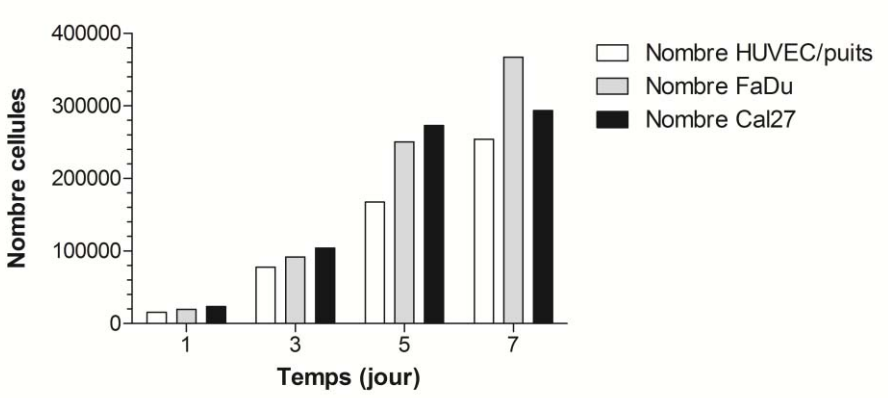


Figure 69 : Courbe de prolifération cellulaire des différents types cellulaires utilisés.

Le temps de doublement (temps pour lequel la population cellulaire est capable de doubler son nombre d'individu) est calculé à l'aide de la relation suivante :

$TD = (T_{72h}-T_{24h})\ \ln 2 / \ln N_{72h} - \ln N_{24h}$

où T_{24h} et T_{72h} sont les temps après 24 et 72 heures de culture respectivement, et N_{24h} et N_{72h} sont le nombre de cellules au temps T_{24h} et T_{72h} respectivement.

Les temps de doublement calculés sont les suivants :

Lignée Cal27 : 20 heures

Lignée FaDu : 19 heures

Cellules endothéliale HUVEC : 21 heures

Le temps de doublement entre les différents types cellulaire utilisés n'est pas très différent, les cellules FaDu sont les plus rapide et ne montre pas d'inhibition de la prolifération au bout de 7 jours de culture contrairement aux Cal27.

Ces courbes de prolifération cellulaire nous a permis de fixer l'ensemencement des cellules à 2×10^4 cellules/cm^2.

II.4. Etude de la formation des structures pseudo-capillaires *in vitro* :

Cette technique nous permet d'évaluer l'effet des milieux (conditionnées ou médicaments) sur la formation de tubes pseudo-capillaires par les HUVEC cultivées sur une matrice et peut être assimilée au mécanisme d'angiogenèse *in vitro*.

II.4.a. Principe :

Les cellules endothéliales cultivées sur une matrice migrent rapidement pour former des structures ressemblant à des capillaires. Ce modèle assez simple permet d'étudier les premières étapes de l'angiogenèse. Ces réseaux sont visualisés par microscopie de fluorescence après marquage des cellules avec un fluorophore puis évalués par la quantification de différents paramètres (densité du réseau, nombre de jonction, longueur du réseau). L'impact des médicaments ou des milieux conditionnés sur la formation de ces réseaux peut ainsi être étudié.

Le Matrigel® est une substance isolée à partir de souris portant le sarcome Engelbrecht HolmŔ Swarm (EHS). La composition exacte de ce produit n'est pas connue mais c'est un mélange complexe de protéines de la membrane basale comme la laminine, le collagène de type IV, les héparanes sulfate, la fibrine et certains facteurs de croissance tels que EGF, TGF-b, PDGF et IGF-1. Le Matrigel® est liquide à + 4°C mais devient solide (gel) après incubation à + 37°C. Il permet d'offrir un support aux cellules en mimant l'environnement naturel et l'initiation d'une réponse angiogénique. Sans support, le processus d'angiogenèse ne peut pas avoir lieu.

II.4.b. **Réactifs :**

Matrigel® (Becton Dickinson, France)

Lame de verre (Marienfeld laboratory, Allemagne)

Phalloïdine-sulforhodamine (SR) (Fluoprobes®, Interchim, France),

Solution de blocage : PBS-BSA 1% (p/v) (Sigma Aldrich, France)

Solution de fixation : paraformaldéhyde (PAF) 4% (p/v) dissout dans PBS sous agitation pendant 1 nuit à + 50°C.

Microscope intravital : AZ100 (Nikon, France) équipé de la camera Digital Light DS-Qi1Mc (Nikon, France) et du logiciel d'analyse d'image « NIS élément software » (Nikon, France).

Logiciel d'analyse des structures pseudocapillaires : Angiosys Software (TCS Cellworks, UK).

II.4.c. **Protocole :**

1) Revêtement des puits (coating) en plaque P24 :

Une lame de verre stérile (et dégraissée avec de l'acétone puis de l'éthanol 70°) est placée dans le fond de chaque puits et recouverte avec 200 µL de Matrigel® dilué au 1/3 dans PBS.

La polymérisation est effectuée à + 37°C dans l'incubateur pendant 30 min à 1 heure.

2) Ensemencement des cellules endothéliales :

Les cellules endothéliales sont mise à cultiver dans des flasques jusqu'à sub-confluence.

Les cellules sont détachées (Cf. protocole paragraphe I.1.b.3) et une numération cellulaire de la suspension est réalisée (Cf. paragraphe II.1.c).

Les cellules sont ensemencées à 90000 cellules/cm^2 dans du milieu complet.

Les cellules adhèrent au support pendant l'incubation d'1 heure à + 37°C dans l'incubateur à CO_2.

3) Changement de milieu et traitement des cellules :

Le milieu de culture est éliminé et un lavage est effectué avec 500 µL PBS.

Puis, 500 µL de milieu à tester sont déposés dans chaque puits et laissé à incuber pendant 48 heures.

4) Fixation des cellules :

Le milieu de culture est éliminé délicatement.

2 lavages avec PBS sont effectués avec douceur.

Puis, 300 µL de la solution de fixation sont ajoutés et laissé à incuber pendant 20 minutes à température ambiante.

Après 3 lavages avec PBS les plaques sont conservées à + 4°C jusqu'au marquage par fluorescence.

II.4.d. **Analyse par microscopie de fluorescence :**

II.4.d.1. Marquage des cellules endothéliales (Phalloïdine) :

Les cellules endothéliales formant le réseau capillaire sont marquées par la phalloïdine-SR, molécule permettant la visualisation de l'actine (protéines du cytosquelette).

1) Les cellules sont perméabilisées avec 200 µL d'une solution de méthanol à froid (- 20°C) pendant 15 minutes.

2) Après avoir éliminé le méthanol, les sites non spécifiques sont bloqués avec 150 µL de PBS-BSA 1 % pendant 10 minutes.

3) La solution de blocage est éliminée. La phalloïdine-SR est diluée au 1/60ième dans du PBS-BSA 1 %. Puis, 150 µL de la dilution sont déposés dans chaque puits et laissé à incuber 45 minutes à T. Amb.

4) Après 3 lavages de 10 minutes avec PBS, les plaques sont conservées à + 4°C jusqu'à l'analyse par microscopie de fluorescence.

II.4.d.2. Analyse des réseaux capillaires :

Les réseaux capillaires sont photographiés à l'aide du microscope à fluorescence.

Les puits ont été entièrement reconstitués grâce à la fonction « Grab image » du logiciel. L'objectif « 0,5 » permettant de prendre des photos avec un champ plus large a été utilisé lors des analyses de la formation des tubes capillaires en présence de la molécule anti-angiogénique EPS4.

La densité du réseau capillaire est calculée avec le logiciel « NIS element » et est donné par le ratio calculé entre l'aire des structures observées et l'aire totale du champ observé. La longueur totale du réseau (incluant les branches) et le nombre de jonctions sont quantifiés avec le logiciel d'analyse des réseaux « Angiosys ».

II.5. Expression des protéines par western blot :

Cette technique nous a permis de mesurer l'effet du médicament ou des milieux conditionnés sur l'expression de certaines protéines par les HUVEC.

II.5.a. Principe :

Une certaine quantité de protéines est séparée par électrophorèse SDS PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de type nitrocellulose puis incubées avec un anticorps spécifique de la protéine à étudier (anticorps primaire). La liaison de l'anticorps à l'antigène (la protéine d'intérêt) est visualisée à l'aide d'un anticorps secondaire (dirigé contre le premier anticorps) et couplé à un fluorophore. La détection s'effectue par chimiluminescence. Les résultats sont normalisés par rapport aux valeurs obtenues avec une protéine dont l'expression n'est pas influencée par l'expérience.

II.5.b. Réactifs :

Kit de dosage des protéines : BCA® protein assay kit (Thermo scientific, France).
Tampon de RIPA : 20 mM Tris-HCL pH 8, 1 % TritonX-100, 200 mM NaCl, 1mM EDTA.
Le tampon de lyse RIPA est complémenté extemporanément avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases :

- complete 1X: (Roche, France)
- 1 % d'inhibiteurs de phosphatases (phosphatase inhibitor coktail 1 et 2, Sigma-Aldrich, France)
- et PMSF (phenyl methane sulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, France).

Marqueur de taille (PM) : Precision Plus Protein™ Standards dual color (Biorad, France)
Tampon de charge 4X (laemmli) : 8 % SDS, 10 % ß mercapto-éthanol, 30 % glycérol, 0,02 % bleu de bromophénol, Tris-HCl 0,25M
Tampon de migration : 18,19 g Tris-Base, 3 g SDS, 86,95g Glycine, ED qsp 3L
Tampon de transfert 10X : 119,2 g Tris Base, 58,6 g glycine, 7,5 g SDS, 2L ED 18MΩ.
Tampon de transfert 1X : 100 mL
Tampon de transfert 10X, 100 mL méthanol, 700 mL ED 18MΩ
Tampon de lavage 10X (TBS) : 36,3 g Tris-Base (500mM), 43,8 g NaCl, ED 18MΩ qsp 500mL. Ajuster le pH à 7,5.

Tampon de lavage 1X (TBS) : 100mL tampon TBS 10X + 900 mL d'ED 18MΩ.
Tampon de lavage (TBST) : 1 L de Tampon TBS + 1 mL de Tween20 (Sigma, France)
Tampon de blocage (TBST-lait) : 1 L de Tampon TBS + 5 % lait écrémé (Régilait)
Membrane de transfert en PVDF (polyvinylidene fluoride) (0,45 µm, Amersham, France)
Papier filtre (Biorad, France).
Substrat de révélation par chimiluminescence : SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific, France).
Système électrophorèse et de transfert liquide : Mini-Protean®Tetra cell (BioRad, France)
Générateur PowerPac™ HC (Biorad, France).
Analyseur d'image : Chemidoc™XRS (BioRad, France) et le logiciel d'analyse d'image Quantity One (BioRad, France).

Composition des gels de polyacrylamide :

Réactifs	Fournisseur	10%	8%	Concentration (5%)
Acrylamide/bis 29 :1 (mL)	Biorad, France	2,5	2	0,625
dH_2O (mL)		2,4	2,9	1,825
Tris/HCl 1,5M pH 8,8 (mL)	Biorad, France	5	5	néant
Tris/HCl 0,5M pH 6,8 (mL)	Biorad, France	néant	néant	2,5
SDS 10% (µl)	Sigma, France	100	100	50
TEMED (µl)	Biorad, France	8,5	8,5	5
APS 10% (µl)	Biorad, France	85	85	50

Tableau 16 : composition des gels de polyacrylamide (technique western blot).

II.5.c. **Protocole expérimental :**

1) Les cellules endothéliales sont ensemencées à une densité de 32000 cellules/cm^2 dans des flasques 25 cm^2.
2) Après 24 heures d'incubation, les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis incubées avec 5 mL des différents milieux conditionnés ou contrôles préparés avec ou sans cetuximab.
3) Les cellules sont laissées à incuber pendant 24 heures.

II.5.d. Extraction des protéines :

1) À l'issue du protocole expérimental, le milieu de culture des cellules est éliminé.

2) Les cellules sont rincées 3 fois avec PBS et incubées avec 300 µL de tampon de lyse pendant 30 minutes sur un lit de glace.

3) Le tapis cellulaire est gratté puis récupéré dans des microtubes.

4) Les échantillons sont ensuite passés au travers d'une aiguille à seringue 23 G : 10 fois.

5) Le lysat cellulaire obtenu est ensuite aliquoté et conservé à - 20°C jusqu'à analyse par western blot.

6) Le dosage du contenu total en protéines dans le surnageant est réalisé sur le principe de la méthode de Lowry à l'aide du kit BCA et utilisé selon les recommandations fournies par le fabriquant. Les concentrations sont calculées en µg/mL à partir d'une gamme étalon de BSA (fourni dans le kit).

II.5.e. Western blot :

1) Les mini-gels sont coulés (Cf. tableau 16), mis à polymériser (30 minutes pour le gel de séparation, 10 min pour le gel de concentration) à température ambiante et montés sur le système d'électrophorèse après avoir éliminé les peignes avec précaution.

2) la cuve est remplie avec le tampon de migration.

3) les échantillons sont mélangés avec du tampon de charge (1X final) et dénaturés par chauffage à + 95°C pendant 5 minutes.

4) 25 µg de protéines sont déposés dans chaque puits (+ 1 puits contenant 10 µl du marqueur de taille).

5) La migration s'effectue à 100 V pendant 2 heures.

6) Le système est démonté et les gels sont déposés sur une membrane PVDF activée au préalable par des 3 bains successifs dans du méthanol et du tampon de transfert. L'ensemble est mis à transférer dans le système de transfert liquide (Transblot) correctement assemblé pendant 1 heure à 350 mA.

7) Les liaisons non spécifiques des membranes sont bloquées pendant 1 heure sous agitation par incubation dans le tampon de blocage.

8) Les membranes sont incubées avec les anticorps spécifiques de la protéine à étudier pendant 1 nuit à + 4°C sous agitation (Cf. tableau 17).

9) Après 3 lavages avec le tampon de lavage TBST, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Cf. tableau 17) pendant 1 heure à température ambiante sous agitation suivi de 3 lavages de 10 min dans du tampon de lavage TBST.
10) La membrane est immergée dans la solution de substrat de révélation pendant 5 min.
11) Les membranes sont ensuite séchées et déposées sur le plateau de l'analyseur d'image.
12) La révélation des bandes s'effectue par illumination des membranes pendant une durée variable selon la protéine cible (de 0,5 à 10 minutes).
13) L'intensité de chaque bande est déterminée à l'aide du logiciel « Quantity One ». Les résultats sont ensuite normalisés en utilisant la protéine β-tubuline comme référence et présentés en expression relative par rapport aux extraits protéiques des cellules non traitées.

Anticorps	Fournisseur	Espèce	Dilution
anti-human β-tubulin (polyclonal)	Santa Cruz, TEBU, France	Souris	1/1000
Anti-human VEGFR-2 (monoclonal)	Santa Cruz, TEBU, France	Souris	1/1000
Anti-human EGFR (polyclonal)	Cell Signaling Technologies, France	Lapin	1/1000
Anti-human PECAM-1 (monoclonal)	DakoCytomation, France	Souris	1/1000
Anti-human Notch-4 (polyclonal)	Santa Cruz, TEBU, France	Lapin	1/1000
horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody	Santa Cruz, TEBU, France	Souris Lapin	1/10000

Tableau 17 : Liste des anticorps avec leur dilution utilisés pour le western blot. Les anticorps sont dilués avec du tampon TBST + 5% de lait demi-écrémé.

II.6. Les microparticules :

II.6.a. La purification des TMV

II.6.a.1. Principe :

Cette étape de purification des milieux conditionnés permet d'éliminer les débris cellulaires et d'avoir ainsi une suspension de microparticules plus homogène.

Lors d'une première étude, nous avions centrifugés les milieux conditionnés de manière à obtenir un culot de microparticules mais les pertes étaient importantes et les suspensions obtenues après mise en suspension des particules étaient plus hétérogènes (d'après les analyses faites par cytométrie en flux et microscopie électronique) mais les résultats ne seront pas présentés dans la suite du manuscrit.

Le protocole présenté répond aux critères internationaux de préparation des microparticules plaquettaires approuvé par le comité international de standardisation scientifique ISTH (244).

II.6.a.2. Réactifs :

Sérum de veau déplété en microparticules (SVFd) : sérum de veau centrifugé à 14000 g pendant 1 heure à + 20°C puis aliquoté et congelé à - 20°C.

II.6.a.3. Protocole :

1) Préparer les milieux conditionnés (CM) comme indiqué au paragraphe II.2 en utilisant du SVFd.

2) Les milieux conditionnés sont répartis dans des tubes coniques de 15 mL (5 mL final).

3) Les tubes sont centrifugés à 2500 g pendant 15 minutes à + 20°C sans frein.

4) 4 ml de surnageant est transféré avec précaution à l'aide d'une pipette automatique de 1000 µL dans un autre tube conique de 15 mL (5 mL final) et centrifugé à 2500 g pendant 10 minutes.

5) Les surnageants sont prélevés toujours avec précaution et transférés dans d'autres tubes de 15 mL (10 mL final).

6) Les suspensions de microvésicules sont analysées immédiatement après leur extraction.

II.6.b. L'analyse de la taille par granulométrie laser :

II.6.b.1. Principe :

La granulométrie laser est une technique basée sur la diffusion dynamique de la lumière (DLS) encore appelée spectroscopie à corrélation de photon (PCS) et permet la détermination de la taille de micro- ou nano-particules en suspension dans un liquide (0,6 nm et jusqu'à 6 microns).

Les molécules en suspension ne sont pas statiques mais subissent le mouvement brownien induit pas les chocs réalisés avec les autres molécules présentes dans le fluide. Lorsque les particules sont éclairées (lumière monochromatique provenant d'un laser), elles diffusent la lumière et leur mouvement brownien produit des fluctuations d'intensité significative au sein de ces signaux qui peuvent être détectés à de nombreux angles différents (Cf. figure 70). L'analyse de ces fluctuations à l'aide d'une fonction d'auto-corrélation donne le coefficient de diffusion et le rayon hydrodynamique des particules peut alors être simplement calculé à l'aide de la relation de Stokes-Einstein. Il est donc possible de déduire avec précision la taille des particules à condition que la viscosité et l'indice de réfraction de la solution soient connus.

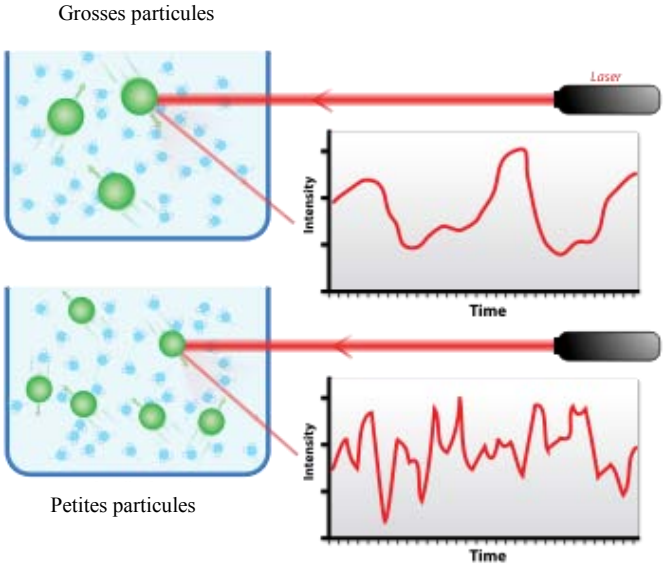


Figure 70 : Principe de mesure de la taille des particules en suspension par DLS. *(Extrait du site internet Wikipédia).* L'amplitude des variations des intensités de la lumière diffusée par les petites particules pendant un temps très court est plus importante que celle de la lumière diffusée par les particules plus grosses, en raison de leur plus grande vitesse.

II.6.b.2. Description de l'appareil :

L'appareil utilisé est le Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) (Cf. figure 71) : il utilise un laser néon-hélium 633 nm comme source lumineuse (N°1) pour éclairer l'échantillon présent dans la cuve (N°2). L'atténuateur permet de réduire l'intensité de la source lumineuse en fonction de la concentration de l'échantillon et du type de particules présent dans la suspension (les petites particules diffusent moins que les grosses particules et il donc faut les éclairer avec un peu plus d'intensité). Le détecteur de rétrodiffusion est situé à 173° (backscatter) de la source lumineuse et récupère les intensités de la lumière diffusée par la suspension. La cuve est thermostatée à la température de mesure (+ 25°C) pendant quelques minutes avant l'analyse car le mouvement brownien augmente avec la température. Le corrélateur (N°5) permet l'analyse des variations des intensités diffusées et transmet au système informatique les données obtenues.

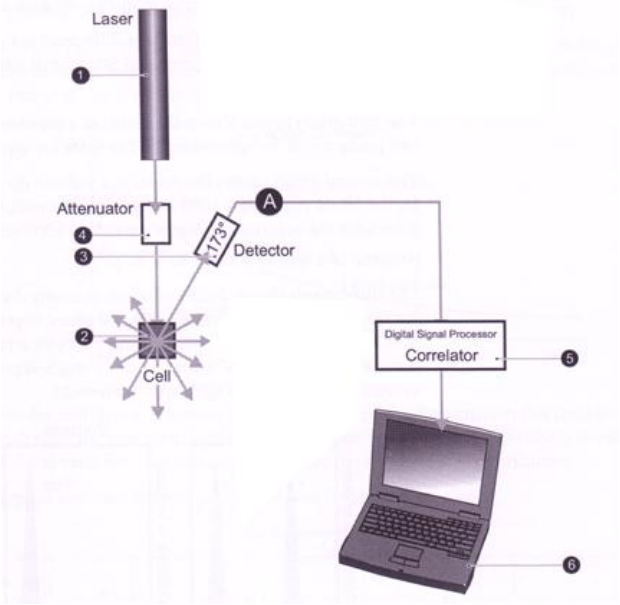


Figure 71 : Schémas descriptif de l'appareil Zétasizer NanoZS *(Malvern Instruments Ltd).*

Cette technique est simple d'utilisation, rapide et offre l'avantage de ne pas imposer d'étape préparative à l'échantillon comme c'est le cas pour la microscopie électronique par exemple. C'est également une technique très sensible et qui nécessite très peu d'échantillon.

II.6.b.3. Utilisation de l'appareil :

Cet appareil n'a pas besoin d'être calibré mais nécessite tout de même une vérification des mesures une fois par semaine grâce à l'analyse d'une suspension de particules monodisperse calibrées (Cf. figure 72).

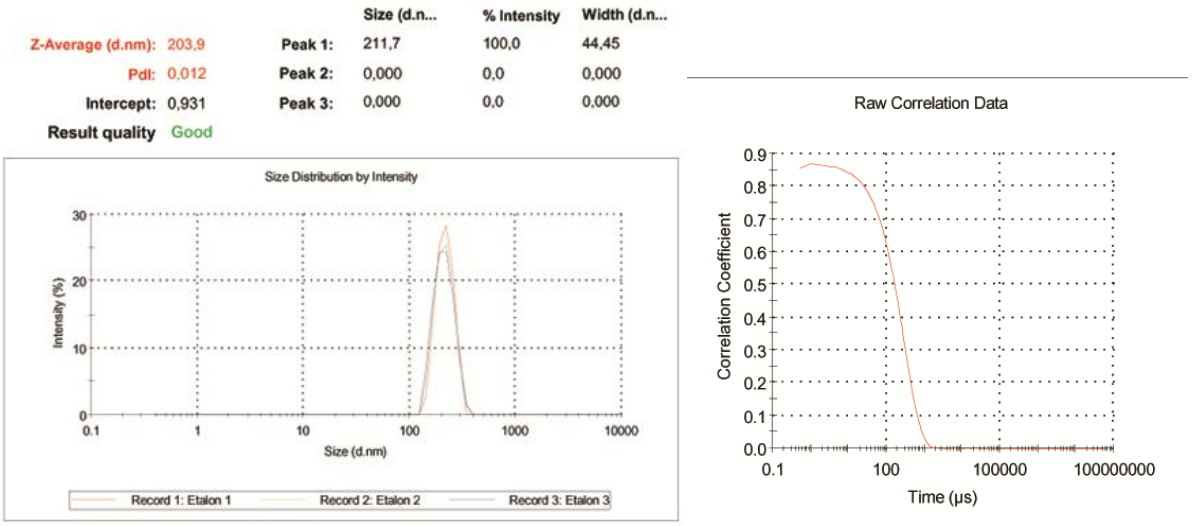


Figure 72 : Exemple d'analyse obtenue avec un contrôle de taille (taille de étalon 200 nm ± 20 nm, Fluka, France).

Nous n'avons pas pu établir l'indice de réfraction et la viscosité de nos milieux de culture servant à la fabrication des microvésicules. Néanmoins, grâce à l'existence de tables de correspondance fournies par le fabriquant de l'appareil, nous avons attribué la valeur suivantes :

- matériel à mesurer (TMV) : indice de réfraction = 1,400 et absorption = 0,010.
- dispersant (eau) : viscosité = 0,8872 CP ; indice de réfraction = 1,330 et constante diélectrique = 78,5.

Cet appareil est très simple d'utilisation, comme un spectrophotomètre :
500 µL d'échantillon à analyser sont déposés dans une cuve en plastique de 1,5 mL et placée dans l'appareil. L'appareil est ensuite paramétré et l'analyse est lancée en appuyant sur START.
L'appareil règle lui-même le focus et l'intensité du laser en fonction de la concentration des échantillons avant d'effectuer les analyses. Après un temps d'équilibration de 30 secondes, il effectue au moins dix mesures de tailles en triplicat par échantillon ce qui lui permet de déterminer la qualité des échantillons. Si les valeurs sont trop différentes, le système indique qu'il y a un problème.

L'indice de polydispersité (PdI) est calculé par le logiciel à partir de l'analyse des cumulants des intensités mesurées. Un PdI de 1 indique que la distribution en taille des particules est large (suspension polydisperse) alors qu'une valeur proche de zéro indique qu'il n'y a pas de variation dans la taille de l'échantillon (suspension monodisperse).

Une fois l'analyse effectuée, l'appareil donne un rapport contenant la valeur moyenne de la taille obtenue pour chaque triplicat en volume ou en intensité ainsi que les graphs de corrélations.

II.6.c. Le marquage des TMV avec un marqueur membranaire fluorescent

II.6.c.1. Principe :

Les microvésicules sont des particules assez fragiles qui ne supportent pas les centrifugations à haute vitesse. C'est pourquoi nous avons préférés effectuer un marquage indirect : les cellules tumorales ont d'abord été marquées avec un marqueur membranaire fluorescent et cultivées. Les milieux conditionnés contenant les microparticules fluorescentes ont ensuite été récoltés.

II.6.c.2. Réactifs :

Solution mère de DiO (FluoProbes®, Interchim, France) : reconstitution à 14,2 mM (12,5 mg/mL) avec DMSO, conservation à température ambiante.
Solution DiO à 1 mM : dilution de la solution mère de DiO dans du PBS.

II.6.c.3. Protocole :

1) Les cellules tumorales sont détachées de leur support de culture par trypsinisation classique (Cf. paragraphe I.2.b.2).
2) 10 x 10^6 cellules sont incubées avec 5 mL de DiO 2 µM dilué extemporanément dans du PBS pendant 15 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Un tube contrôle (sans cellule) est réalisé avec du PBS (pour remplacement les cellules) et du DiO et servira de contrôle négatif pour les analyses de cytométrie en flux et d'imagerie en flux.
3) La réaction de marquage est stoppée par addition de 5 mL de milieu de culture.
4) La suspension cellulaire est centrifugée pendant 10 minutes à 300 g.
5) Le culot est resuspendu avec 10 mL de milieux complet.

6) La suspension est ensuite transférée dans un autre tube et centrifugé.

7) Le culot est resuspendu avec 10 mL de milieux complet et les cellules sont comptées (Cf. paragraphe II.1).

8) Les cellules tumorales marquées sont ensemencées à ≈ 3 x 10^6 cellules par flasque de 75 cm^2.

9) Après 24 heures d'incubation à + 37°C 5 % CO_2, le milieu de culture est éliminé et remplacé par du milieu de culture contenant 2 % SVF ± 20 µg/mL cetuximab. La figure 73 montre le marquage cellulaire obtenu après 24 et 48 heures de culture.

10) Après 48 heures d'incubation, 5 mL de milieux conditionnés sont transférés dans un tube de 15 mL stérile et centrifugé à 2500 g pendant 15 minutes à + 20°C sans frein.

11) Les surnageants sont prélevés avec précaution avec une pipette automatique de 1 mL et transférés dans un autre tube de 15 mL : centrifugation 2500 g 15 minutes à + 20°C sans frein.

12) Les surnageants sont prélevés et les suspensions de microvésicules sont prêtes à être utilisées.

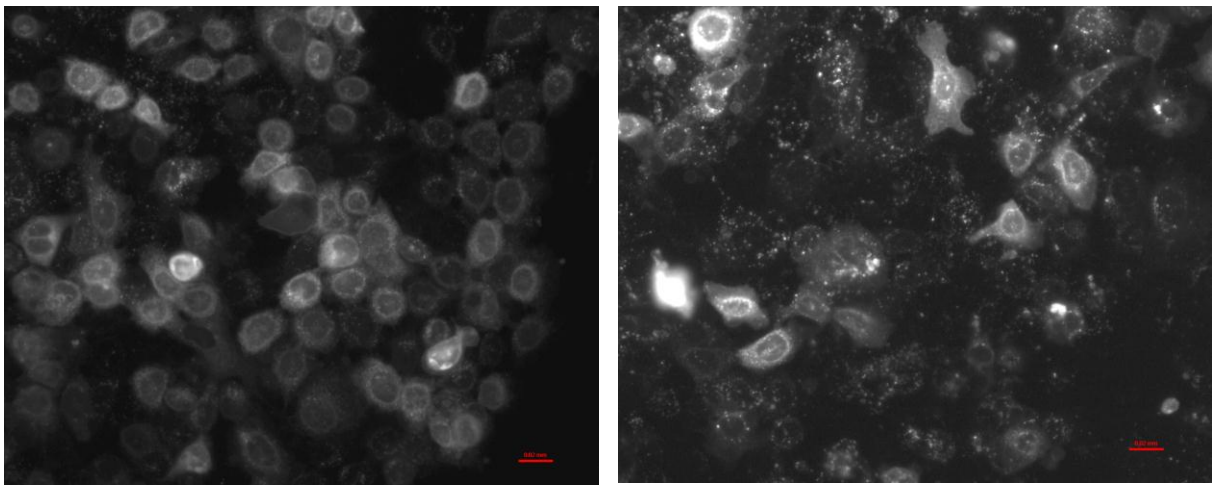


Figure 73 : Observation des cellules FaDu marquées au DiO après 24 heures (à gauche) et 48 heures (à droite) d'incubation à +37°C 5% CO2. Barre d'échelle 20 µm (en rouge). Le DiO s'insère dans la memebrane des cellules de manière homogène Les petits points observés après 48 heures de cultures peuvent être des microvésicules (peu nombreux à 24 heures).

Nous avions effectué au préalable un essai de marquage avec le PKH67 (Sigma Aldrich, France) mais ce marqueur ne nous a pas donné satisfaction (Cf. figure 74). En effet, on ne voit

pas les cellules mais plein de petits points partout. Le marquage n'est pas homogène et ce marqueur n'a pas été utilisé par la suite.

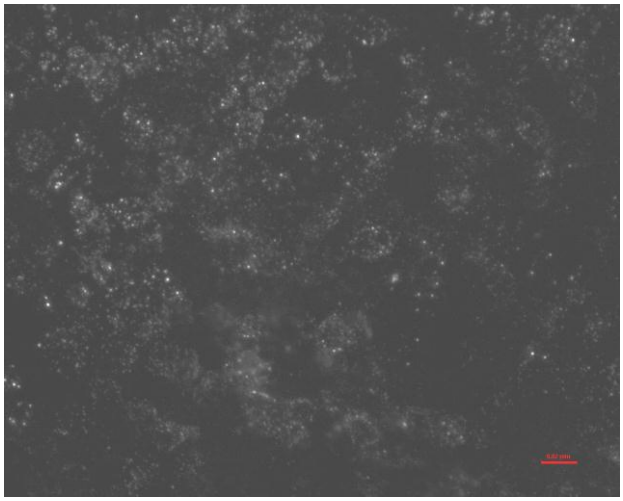


Figure 74 : Image des lignées FaDu marquées en monocouche avec PKH67 (110 nM dans éthanol 1% PBS, incubation 3 minutes avant lavages et culture dans milieux complet) et cultivées pendant 48 heures. Barre d'échelle 20 µm. Le PKH67 ne s'insère pas dans la membrane des cellules de manière homogène. Le marquage des cellules apparaît sous forme de spot ; cette méthode de marquage n'est pas utilisable pour fabriquer des microvésicules fluorescentes

II.7. La cytométrie en flux

Cette technique a permis d'une part d'évaluer l'influence des traitements sur le nombre de TMV libérés par les cellules tumorales mais également de quantifier l'expression de différents marqueurs à la surface de ces microparticules et des cellules tumorales dont elles sont issues.

II.7.a. **Principe :**

Cette technique repose sur la mesure de paramètres physiques (taille relative, granulosité) et biologiques (intensité relative de immunofluorescence) de cellules isolées entrainées par un flux liquide et défilant à une grande vitesse devant un faisceau lumineux monochromatique excitateur. La lumière émise est séparée de la lumière excitatrice par l'emploi de filtres optiques adaptés et est amplifiée par un photomultiplicateur. Les signaux lumineux sont convertis en données numériques pouvant être traitées par un système informatique et sont exprimés en unité relative.

L'appareil utilisé est équipé de plusieurs photomultiplicateurs capables de détecter des longueurs d'ondes d'émission différentes et permet des analyses multiparamétriques. De plus, L'appareil comporte 3 lasers d'excitation (bleu, rouge, violet) et augmente ainsi les possibilités d'analyse d'un échantillon. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesurés et les représente sous la forme d'histogramme monoparamétrique (un seul paramètre) ou biparamétrique (deux paramètres) sur la population des événements sélectionnés dans la fenêtre de tri (Cf. figure 75).

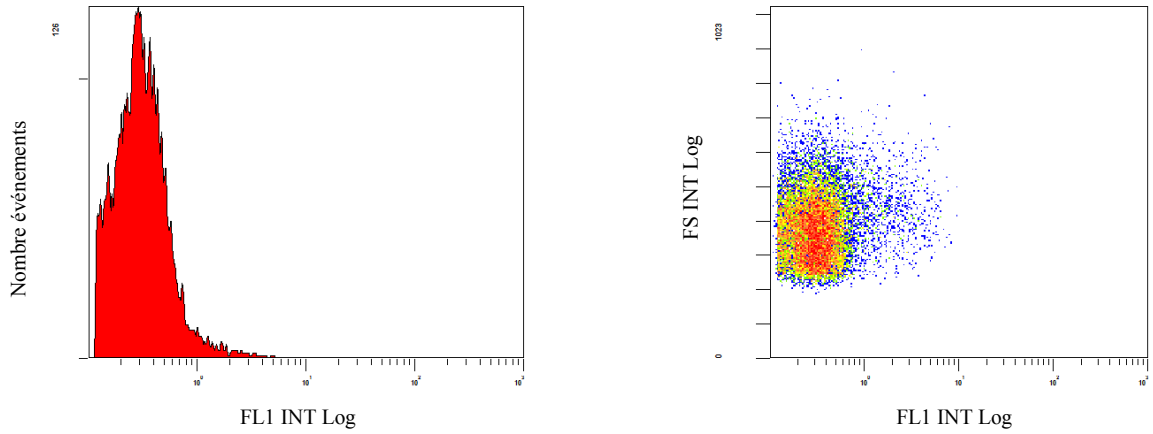


Figure 75 : Représentation des données de cytométrie en flux sous-forme mono- ou bi-paramétrique (à gauche et à droite respectivement).

La diffusion de la lumière aux petits angles (FSC, Forward Scatter Collection) est collectée dans l'axe du faisceau lumineux et permet la mesure des paramètres physiques (renseigne sur la taille de la structure de l'événement mesuré). Cet appareil est doté d'un système amélioré permettant de collecter la lumière diffusée par des particules submicroscopiques et est donc adapté à l'analyse des TMV.

La diffusion de la lumière aux grands angles (SSC, Side Scatter Collection) est collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux et donne des indications sur la structure interne de la structure analysée (granulométrie).

II.7.b. **Contrôles qualités :**

II.7.b.1. Vérification de l'alignement des lasers :

Une suspension de billes fluorescentes calibrées (Flow-Check® Fluorospheres, Beckman Coulter, France) est utilisée pour la vérification journalière de l'alignement optique et des

circuits fluidiques de l'appareil. Elles sont excitables à 488 nm et émettent une fluorescence entre 525 nm à 700 nm et permet de vérifier tous les canaux en même temps.

II.7.b.2. Vérification des intensités :

Un mélange de billes calibrées d'intensité et de taille différentes est également utilisé pour vérifier la stabilité de l'appareil en fonction du temps. Elles sont excitables à toutes les longueurs d'onde (365 à 650 nm) ce qui permet leur utilisation sur tous les canaux de l'appareil en un seul passage.

Ces billes (SPHERO® Rainbow Calibration Particles, Spherotech, USA) ont été analysées avant chaque expérience nécessitant la mesure de l'intensité de fluorescence. Il s'agit d'un mélange de 8 billes de tailles différentes. Nous avons regardé les intensités des populations de billes bien séparées et dont la valeur est proche des valeurs obtenues pour les expérimentations (Cf. figure 76).

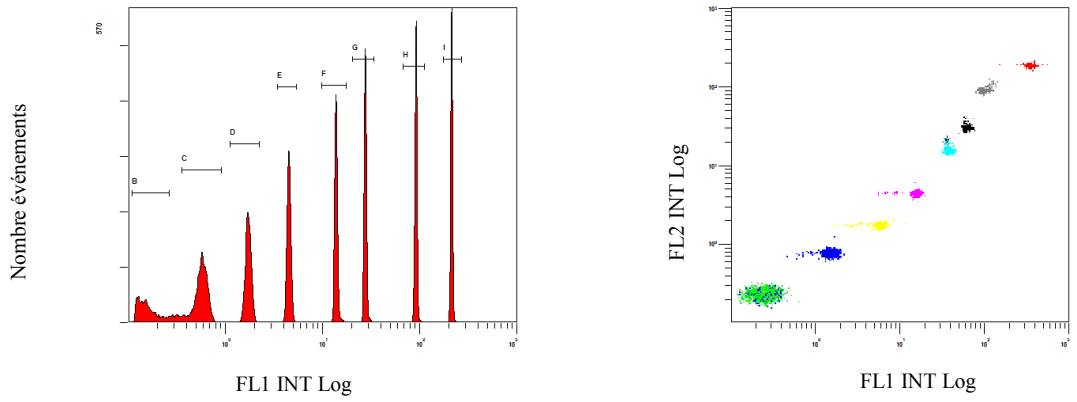


Figure 76 : Exemple d'histogramme obtenu lors de l'analyse des billes Rainbow : exemple du canal FL1 (FITC).

L'évolution des intensités au cours du temps est donnée dans la figure 77.

Quelque soit le canal observé, l'intensité des différentes billes est linéaire dans le temps, on observe une légère augmentation en fonction du temps pour le pic correspondant à la valeur la plus élevée, valeur non atteinte lors de nos expériences.

L'échelle des intensités n'est pas linéaire et augmente de façon exponentielle avec le signal.

La dispersion des valeurs est proportionnelle à l'intensité des billes avec un pourcentage de variation identique pour chaque type de billes (Cf. tableau 18).

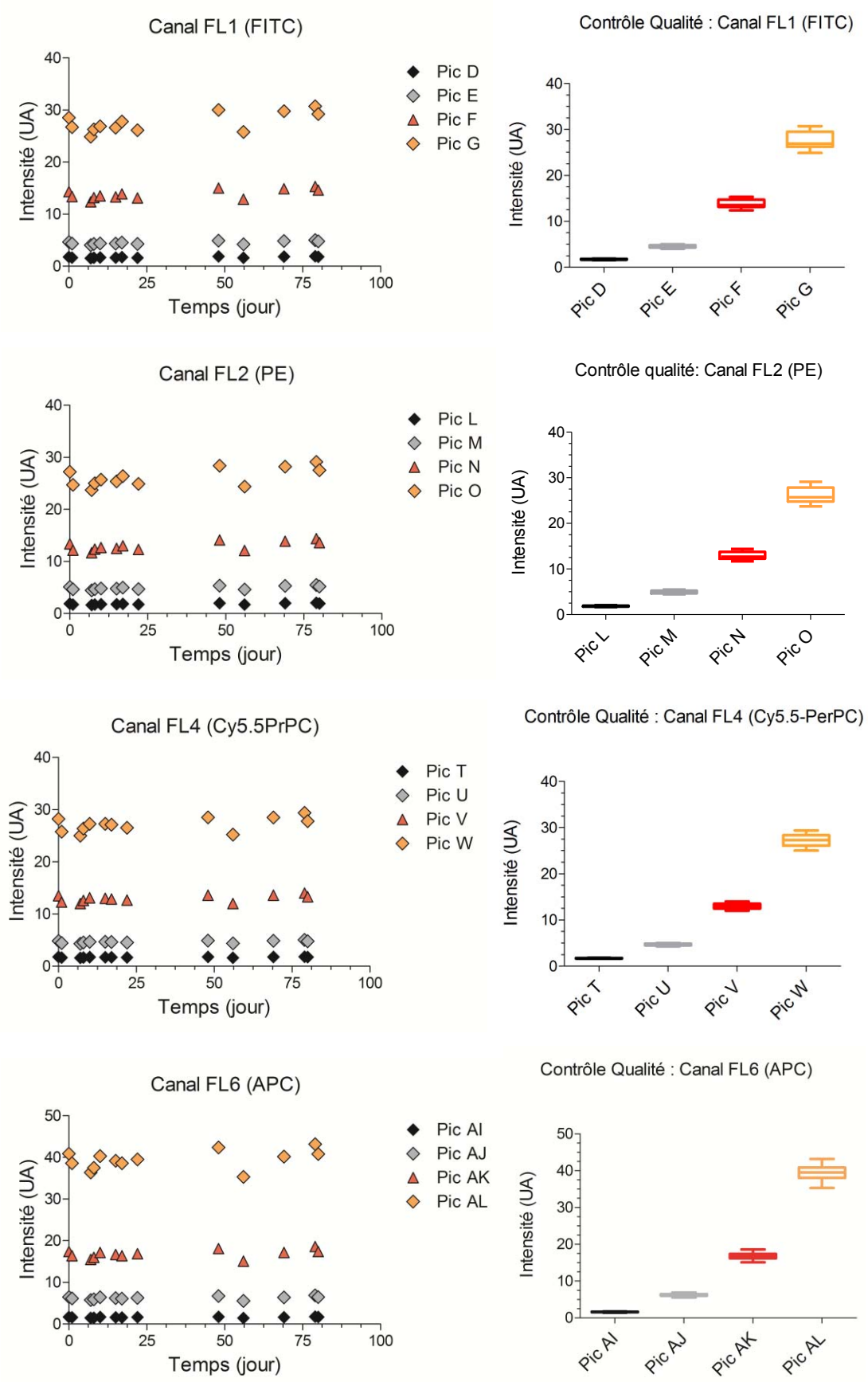


Figure 77 : Contrôle qualité du cytométrie en flux : variation des intensités des différents canaux utilisés : représentation des intensités en fonction du temps (à gauche) et des intensités obtenues pour chaque type de billes ou pic (à droite). La valeur des intensités est stable dans l'intervalle de temps étudié.

Canal / Pic	Pic 1	Pic 2	Pic 3	Pic 4
FL1	1,7 ± 0,1 (6%)	4,5 ± 0,3 (7%)	13 ± 1 (8%)	27 ± 2 (7%)
FL2	1,8 ± 0,1 (6%)	4,9 ± 0,3 (6%)	12 ± 1 (8%)	25 ± 2 (8%)
FL4	1,7 ± 0,1 (6%)	4,7 ± 0,2 (4%)	13 ± 1 (8%)	26 ± 1 (4%)
FL6	1,6 ± 0,1 (6%)	6,3 ± 0,4 (6%)	16 ± 1 (6%)	39 ± 2 (5%)

Tableau 18 : Contrôle qualité du cytométre en flux : valeurs des intensités pour chaque canal.

II.7.c. **Immunomarquage :**

Les récepteurs exprimés à la surface des cellules ou des TMV sont reconnus spécifiquement par un anticorps dirigé spécifiquement contre l'antigène désiré et marqué par un fluorophore (marquage direct).

II.7.c.1. Les réactifs utilisés :

Les caractéristiques des anticorps sont présentées dans le tableau 19 ci dessous.

Le contrôle négatif est un contrôle isotypique : les cellules sont incubées avec un anticorps monoclonal du même isotype que l'anticorps spécifique et également couplé avec le même fluorochrome. Il permet également de régler les compensations du protocole lorsque le marquage est multiple. Il est préparé et analysé en même temps que les échantillons.

Anticorps	Fournisseur Espèce	Type d'échantillon	Dilution	Volume (µL)
Anti-EGFR-FITC	AbD Serotec,	Lignées	1/10	20
ISO-FITC (10X)	(Rat)	HUVEC	1/10	10
		TMV	1/10	5
Anti-TF-PE (CD-142)	BD Biosciences	Lignée	Pur	10
ISO-PE	(Souris)	HUVEC	Pur	10
		TMV	1/2	4
Anti-Epcam-Cy5.5PrPC	BD Biosciences	Lignée	Pur	10
ISO-CY5.5PrPC	(Souris)	HUVEC	Pur	10
		TMV	1/2	4
Annexine-V-APC	BD Biosciences	Lignée	Pur	5
		HUVEC	Pur	2
		TMV	1/10	2

Tableau 19 : Caractéristiques et volumes des anticorps utilisés pour les immunomarquages. (Remarque : l'anticorps isotypique FITC étant dix fois plus concentré que l'anticorps anti-EGFR-FITC, il a été dilué au préalable au 1/10ième).

PBS (Sigma-Aldrich, France)

Tampon annexine-V : Annexin-V Binding Buffer, 10X (BD Pharmingen®, Becton Dickinson, France).

Solution de fixation : PAF à 1 % p/v (Sigma, France) dans PBS.

Tube cytométrie en flux (Beckman Coulter, France).

Billes fluorescentes utilisées pour la calibration du protocole « microvésicules » : Mégamix® (Diagnostica Stago S.A.S, France).

Cytomètre en flux : Navios (Beckman Coulter, France) + logiciel « cytometry list mode data acquisition & analysis NaviosTM cytometer 1.0 » (beckman Coulter, France).

II.7.c.2. Immuno-marquage des cellules tumorales :

1) Les cellules cultivées en flasque de culture 75 cm^2 sont détachées de leur support par trypsinisation classique (Cf. méthode de culture des lignées cellulaires) et mises en suspension dans 10 mL de milieu de culture.

2) Après comptage, 10^6 cellules sont mises à centrifuger et le culot est resuspendu avec 1 mL de tampon annexine-V dilué au $1/10^{ième}$ avec PBS.

3) 50 µL de la suspension cellulaire sont déposés dans les tubes de cytométrie en flux bien identifiés (type échantillon, type de marquage).

4) le volume correspondant d'anticorps est ajouté (Cf. tableau 19) et les tubes sont mis à incuber 15 minutes à température ambiante dans le noir.

5) La réaction est arrêtée par addition de 500 µL de PBS.

6) les tubes sont mis à centrifuger à 500 g 5 minutes.

7) Le surnageant est éliminé par retournement du tube.

8) Les cellules sont fixées avec 500 µL de solution de fixation.

9) Analyse des tubes par cytométrie en flux.

II.7.c.3. Immuno-marquage des TMV :

1) 500 µL de milieu conditionnés sont déposés dans des tubes de cytométrie en flux bien identifiés (type échantillon, type de marquage).

2) Le volume correspondant d'anticorps est ajouté (Cf. tableau 19) et mis à incuber 15 minutes à température ambiante dans le noir. Pour le marquage avec l'annexine-V, 50 µL de tampon annexine sont ajoutés pour permettre sa fixation sur la membrane.

3) Incubation 30 minutes à température ambiante dans le noir.

8) Vortexer le tube extemporanément avant l'analyse par cytométrie en flux.

II.7.c.4. Immuno-marquage des cellules endothéliales :

1) Les cellules cultivées en flasque de culture 25 cm^2 sont détachées de leur support par trypsinisation classique (Cf. méthode de culture des cellules endothéliales) et mises en suspension dans 5 mL de milieu de culture.

2) Après comptage, 10^6 cellules sont mises à centrifuger et le culot est resuspendu avec 1 mL de tampon annexine dilué au $1.10^{ième}$ dans du PBS.

3) 50 µL de la suspension cellulaire sont déposées dans les tubes de cytométrie en flux bien identifiés.

4) Le volume correspondant d'anticorps est ajouté (Cf. tableau 19) et les tubes sont mis à incuber 15 minutes à température ambiante dans le noir.

5) La réaction est arrêtée par addition de 500 µL de PBS.

6) les tubes sont mis à centrifuger à 500 g pendant 5 minutes.

7) Le surnageant est éliminé par retournement du tube.

8) Les cellules sont fixées avec 500 µL d'une solution de PAF 1 %.

9) Analyse des tubes par cytométrie en flux.

II.7.d. Analyse des échantillons :

1) Avant toute analyse, l'appareil est lavé en passant un tube contenant une solution de lavage suivi de trois tubes contenant de l'eau pour le rinçage.

2) L'alignement des lasers est ensuite vérifié en passant les billes Flow Check : le flacon est vortexé vigoureusement pendant 30 secondes et 10 gouttes sont déposées dans un tube de cytométrie. Le protocole « alignement bleu red violet C » est lancé par le bouton « autoscheduler ». L'appareil valide automatiquement les différents canaux s'il y a lieu.

Puis un rinçage est effectué systématiquement avec un tube contenant de l'eau.

3) L'intensité des lasers est contrôlée grâce à l'analyse des billes fluorescentes Rainbow : le flacon est vortexé vigoureusement pendant 30 secondes et 1 goutte est déposée dans un tube de cytométrie contenant 300 µL de PBS. Le protocole « spherorainbow » est utilisé pour l'analyse.

Puis un rinçage est effectué systématiquement avec un tube contenant de l'eau.

4) Les analyses des cellules sont effectuées en séries contrairement à celles des microparticules qui nécessitent 2 rinçages à l'eau avant toute analyse ; les tubes sont passés un par un.

L'analyse des échantillons est effectuée pendant 300 secondes.

II.7.d.1. Analyse des cellules :

Le protocole est déterminé et réglé en fonction du type cellulaire et des marqueurs utilisés :

La population est repérée sur le scattogramme représentant la taille en fonction de la granulosité (Cf. figure 78). Une fenêtre prenant en compte uniquement cette population est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, ou les doublets et triplets de cellules.

La tension du photomultiplicateur (PMT) est réglée, à l'aide de l'histogramme représentant les intensités de fluorescence du fluorophore considéré, de manière à ce que les cellules non marquées apparaissent négatives, en dessous de 0 sur l'échelle logarithmique (10^0) (Figure 74). La tension du PMT ne doit plus être touchée après ce réglage afin de ne pas faire d'erreur sur la lecture des intensités de fluorescence des échantillons analysés. Le seuil de positivité est déterminé à l'aide des cellules marquées avec un contrôle isotypique (Cf. paragraphe II.7.e). L'intensité de fluorescence de la population cellulaire est mesurée automatiquement par le cytomètre en flux et analysée à l'aide du logiciel fourni par le fabriquant.

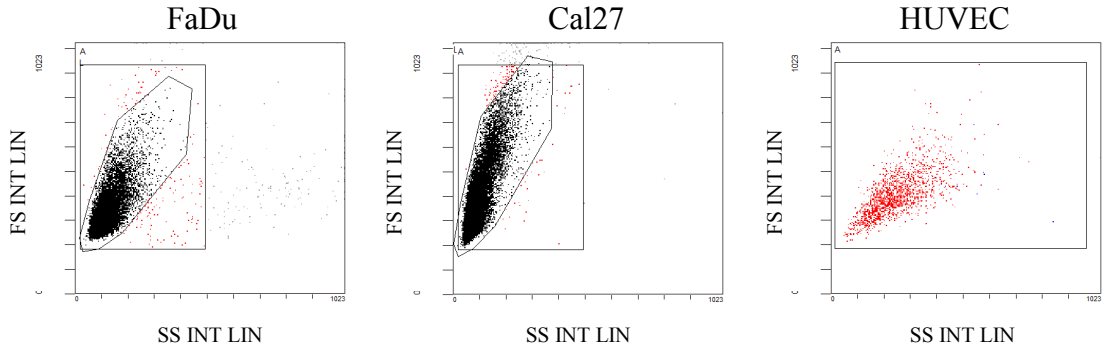


Figure 78 : Cytométrie en flux : exemple de scatogramme obtenu lors de l'analyse des cellules. Représentation de la taille en fonction de la struture lors de l'analyse des cellules FaDu (à gauche), Cal27 (au centre) et HUVEC (à droite).

II.7.d.2. Analyse des microvésicules :

L'analyse des microvésicules nécessite l'utilisation de billes de différentes tailles afin de repérer les événements correspondant à ces particules dont la taille est inférieur à 1 µm (Cf.

figure 79 A). Une fenêtre est dessinée sur le scatogramme représentant l'intensité FL1 (marqueur des billes) en fonction de la taille (FS) (Cf. figure 79 B). Dans la suspension, le nombre de billes par volume est la même pour les billes de 0,5 et 0,9 µm ; le canal FL1 est réglé de telle sorte à obtenir 50 % pour chaque population de bille (Cf. Figure 79 C).
La suite de l'analyse est identique à celle des cellules (Cf. paragraphe ci-dessus).

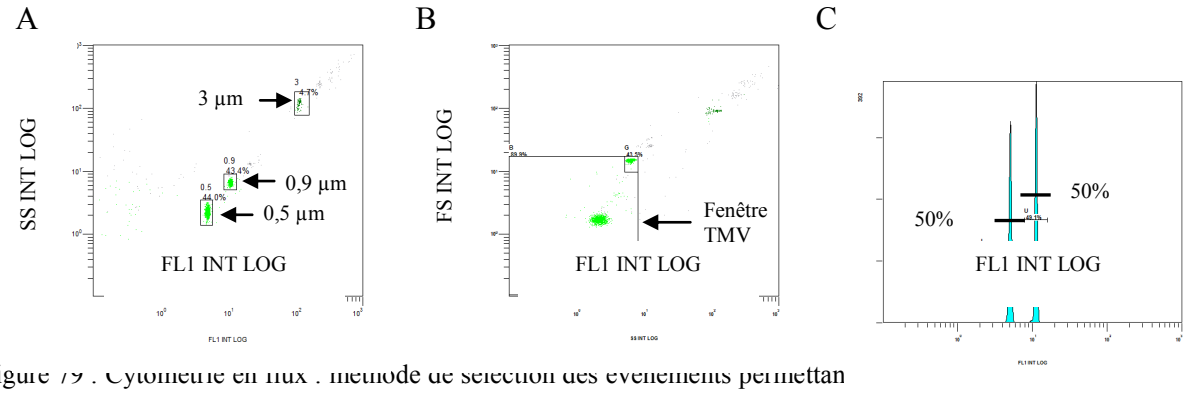


Figure 79 : Cytométrie en flux : méthode de sélection des événements permettan
une suspension commerciale de billes fluorescente calibrées de tailles égale à 0,5 0,9 et 3µm (A) est utilisé pour effectuer les réglages de l'appareil permettant la sélection des événements dont la taille est en dessous de 0,9 µm (B) c'est-à-dire les événements correspondant aux microparticules. Dans la suspension Mégamix®, il y a autant de billes de 0,5 µm que de 0,9 µm ; le canal FL1 est réglé de manière à obtenir environ 50 % pour chaque population (50 % ± 2 %).

II.7.d.3. Exemple d'analyse :

Les contrôles isotypiques permettent de déterminer un seuil au-delà duquel les échantillons sont considérés comme positifs, c'est-à-dire exprimant l'antigène testé. Voici des exemples de contrôles isotypiques obtenus avec les lignées tumorales Cal27 (Cf. Figure 80) et les TMV (Cf. Figure 81).

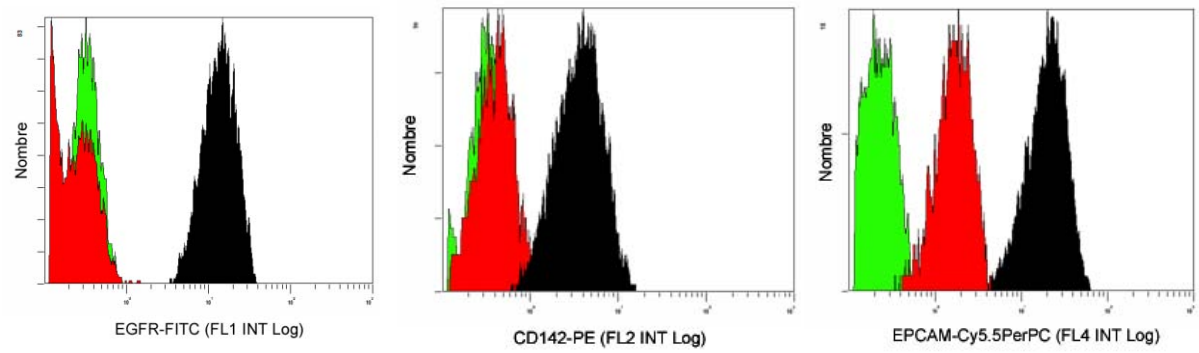


Figure 80 : Cytométrie en flux : représentation des marquages obtenus avec les cellules Cal27 : cellules non marquées en vert, contrôle isotypique en rouge et marquage spécifique en noir.

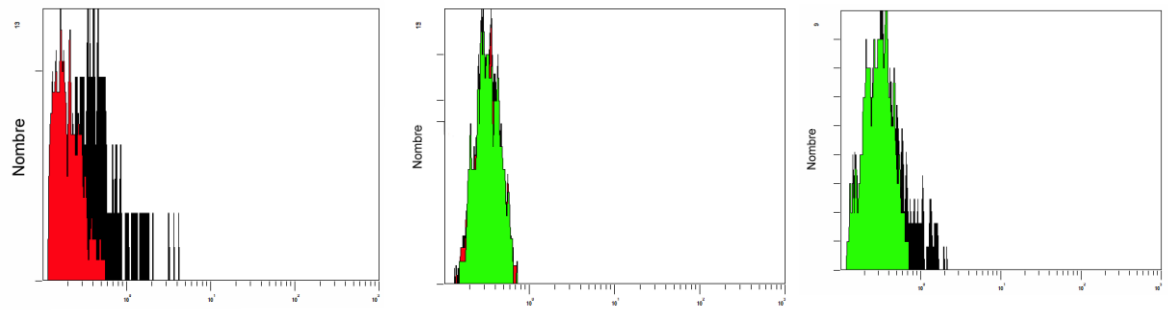


Figure 81 : Cytométrie en flux : représentation des marquages obtenus avec les TMV- Cal27 : TMV non marquées en vert, contrôle isotypique en rouge et marquage spécifique en noir.

Voici également un exemple d'histogramme obtenu lors de l'analyse du marquage des cellules tumorales au DiO (Cf. figure 82) et des TMV libérées dans les milieux conditionnés (CM) (Cf. figure 83).

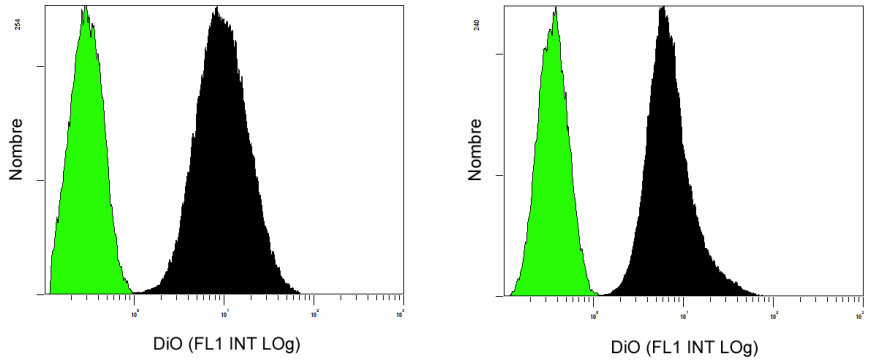


Figure 82 : Cytométrie en flux : marquages des lignées avec le DiO : Cal27 à gauche, FaDu à droite. Marquage DiO en noir, non marqué en vert.

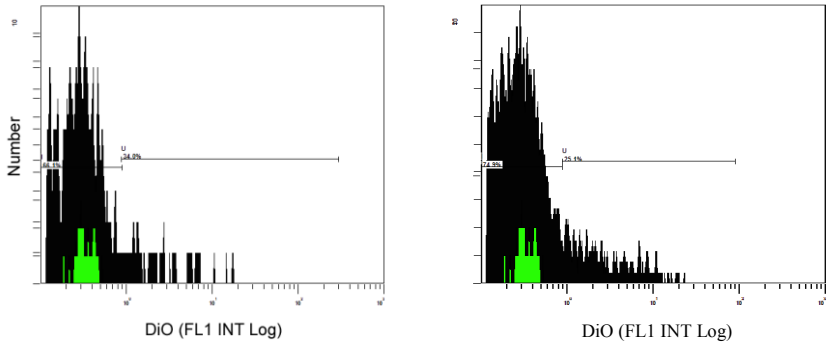


Figure 83 : Cytométrie en flux : représentation des marquages des TMV avec le DiO : TMV-Cal27 à gauche, TMV-FaDu à droite. Marquage DiO en noir, milieu contrôle en vert.

II.8. Etude de la fusion des TMV avec les CE par cytométrie et imagerie en flux:

II.8.a. Principe de l'imagerie en flux :

La technique d'imagerie en flux combine les avantages d'un cytomètre en flux (vitesse, sensibilité et quantification) avec ceux d'un microscope (image détaillée des éléments observés). Il est équipé de 5 lasers d'excitation et des objectifs x20, x40 et x60. Elle nous a permis d'observer les interactions entre les cellules endothéliales et les TMV libérés par les cellules tumorales traitées ou non avec le cetuximab.

Cette technique repose donc sur la mesure de paramètres physiques et biologiques comme pour la cytométrie en flux mais couplé à une caméra permettant la visualisation en direct des cellules défilant à une grande vitesse devant le faisceau lumineux. Les signaux lumineux émis par les cellules sont recueillis et traités par un système informatique (Cf. figure 84).

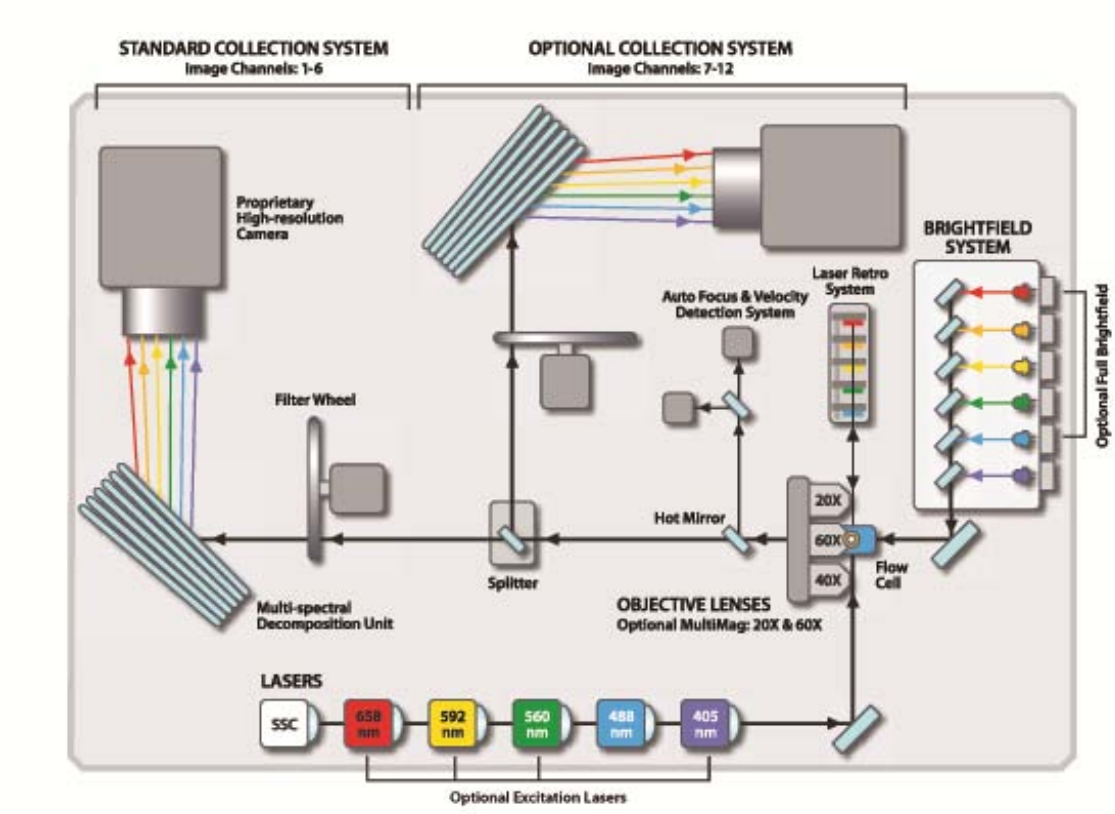


Figure 84 : Principe de fonctionnement de l'Image StreamX®. *(Amnis, USA).*

II.8.b. Réactif :

PBS-PAF-1 % (p/v) (Sigma-Aldrich, France)

Cytométrie en flux : Navios (Beckman Coulter, France)

Imagerie en flux : Image StreamX® (Amnis, USA) et son logiciel IDEAS (version 2010).

II.8.c. Protocole expérimental :

1) Les cellules HUVEC sont ensemencées à 800000 cellules par boite de 25 cm^2 et incubées pendant 24 heures à + 37°C.

2) Le milieu de culture est remplacé par 4 ml de suspension de TMV marquées avec DiO (Cf. protocole de préparation paragraphe II.6.c.3).

3) Incubation à + 37°C 5 % CO_2 pendant 24 ou 48 heures.

4) Elimination du surnageant

5) Les cellules endothéliales sont détachées de leur support par trypsinisation classique (Cf. protocole paragraphe I.1.b.3).

6) Le culot est resuspendu avec 500 µl de PAF-1 % pour les analyses de cytométrie en flux ou avec 250 µl dans le cas d'une analyse par imagerie en flux.

II.8.d. Analyse par cytométrie en flux

Après avoir réalisé le protocole expérimental, les tubes sont directement analysés par cytométrie en flux (Cf. paragraphe II.7.d).

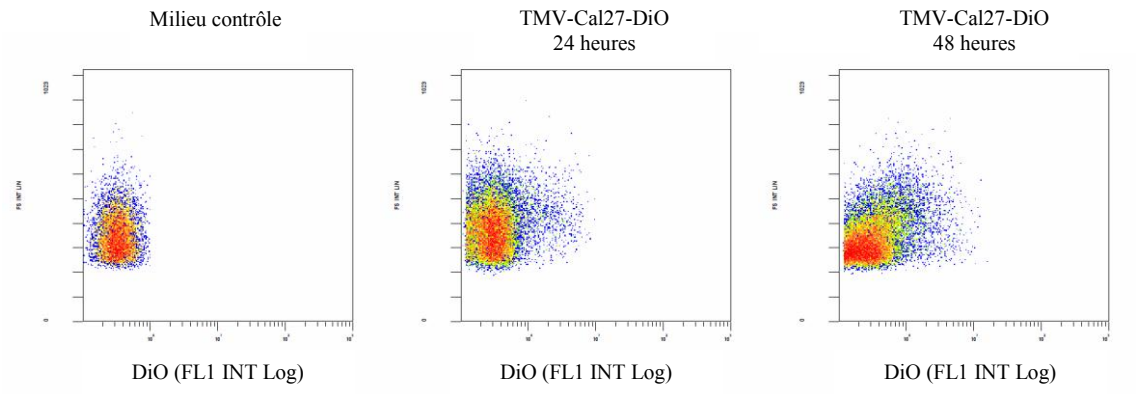


Figure 85 : Cytométrie en flux : essai de fusion entre les HUVEC et TMV-Cal27-DiO : représentation du nombre en fonction des intensités en haut à gauche (milieu contrôle en vert, après 24 heures d'incubation en noir, après 48 heures d'incubation en gris) et la structure en fonction des intensités.

II.8.e. Analyse par imagerie en flux

Après avoir réalisé le protocole expérimental les cellules sont marquées de la manière suivante :

1) 70 µL de cellules sont déposés dans un microtube.
2) 5 µL d'anticorps anti-CD44 utilisé non dilué sont ajoutés dans le microtube.
3) Incubation 30 minutes à température ambiante dans le noir.
4) Analyse des tubes par Imagerie en flux.

L'appareil effectue lui-même ses réglages en passant les billes contrôles.
Les intensités et les compensations sont réglées avec les contrôles isotypiques préparé en même temps que les échantillons et avec le contrôle de la préparation c'est-à-dire le tube contrôle sans cellule réalisé lors de la préparation des TMV-DiO).

II.9. Mesure de l'activité pro-coagulante des TMV par thrombinographie

II.9.a. Principe :

La thrombinographie est une technique permettant de suivre la cinétique de génération de thrombine à partir d'un substrat fluorescent dans des conditions bien définies et reproductibles. Selon le profil obtenu sur le thrombinogramme (Cf. figure 86) et les valeurs des différents paramètres calculés, cette technique permet de déduire la réactivité du système de coagulation d'un patient. Nous l'utilisons ici pour étudier l'influence des TMV sur la coagulation d'un plasma pauvre en plaquette.
La thrombine est générée dans le plasma en présence de facteur tissulaire, du calcium et de phosphololipides anioniques (PS, PC, PE). Ces derniers peuvent être apportés au système par ajout d'un réactif exogène ou être présent dans l'échantillon à tester ou le plasma riche en plaquette (PRP).
La quantité de thrombine active est mesurée par conversion d'un substrat fluorescent de la thrombine (Z-Gly-Gly6Arg-AMC).
La génération de thrombine peut être découpée en 3 phases :

- phase d'initiation et d'amplification correspond au déclanchement de la réaction et est caractérisé par son temps de latence,

- phase de propagation pendant laquelle la génération de la thrombine s'effectue de manière exponentielle,

- phase de terminaison qui est lié à l'appauvrissement du milieu en substrat ; la concentration de thrombine générée diminue jusqu'à revenir à l'état de base (zéro).

II.9.b. **Réactifs**

Fluorimètre : Fluoroskan Ascent (ThermoFischer, France) avec le logiciel dédié Thrombinoscope® version 3.0.0.29 (Thrombinoscope BV, The Netherlands).

Subtrat couplé à un fluorophore : Z-Gly-Gly-Arg-AMC (Bachem, Switzerland)

Tampon calcium : Hépes 20 mM, BSA 60 g/L, $CaCl_2$ 102 mM, pH 7.5

Calibrant thrombine (Thrombinoscope BV, The Netherlands)

PPP Low® : mélange de TF et PL (Diagnostica Stago, France)

PRP Reagent® : TF seul (Diagnostica Stago, France)

MP Reagent® : PL seul (Diagnostica Stago, France)

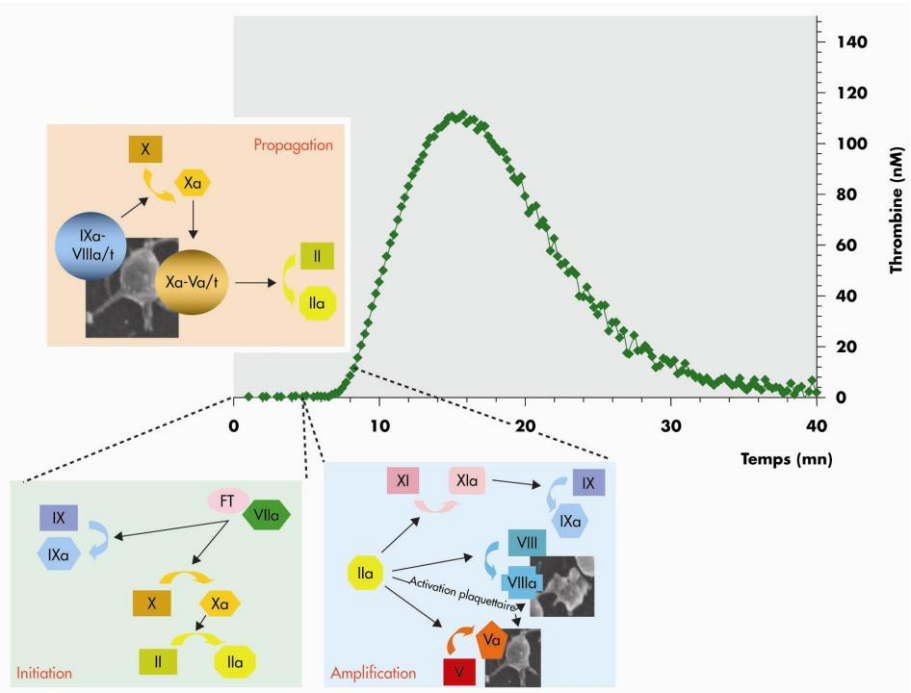


Figure 86 : Thrombinographie : les différentes phases de génération de thrombine : phase d'initiation à gauche, phase d'amplification à droite. (Extrait de Lecompte, Hématologie, 2006) (245).

II.9.c. **Protocole :**

II.9.c.1. Préparation du plasma pauvre en plaquette (PPP) :

Le sang de volontaires sains est prélevé au niveau de la veine du pli du coude dans des tubes contenant du citrate 0.109 M (1/9 vol/vol) comme anticoagulant.
Le sang est ensuite centrifugé à 2500 g pendant 15 minutes à + 20°C puis le PPP est récupéré puis congelé à - 80°C jusqu'à utilisation.
La décongélation s'effectue par une incubation de 10 min à + 37°C au bain marie.

II.9.c.2. Préparation des TMV :

1 ml d'échantillon contenant les TMV sont transférés dans un microtube.
Les TMV sont centrifugées à 15000 G pendant 1 heure à + 20°C.
900 µL de surnageant sont délicatement prélevés et éliminés.
Les TMV sont re-suspendues avec 900 µL de PPP.
Le témoin a été réalisé avec le milieu de culture n'ayant pas été mis en contact avec les cellules et traité comme les autres échantillons ; ils ne contiennent pas de TMV.

II.9.c.3. Réalisation du test :

La génération de thrombine a été mesurée selon la méthode CAT (calibrated automated thrombin) de Lecompte et al (246). Tous les échantillons sont testés en triplicat.
Tous les réactifs sont pré-chauffés à + 37°C au bain marie avant de réaliser le test.

Dans les puits d'une plaque 96 puits, déposer selon le plan de plaque rentré dans le logiciel du fluorimètre :
20 µL de réactif PPP low® (1 pM FT, 4 µM PL final) ou PRP reagent® (1 pM FT final) ou MP reagent® (4 µM PL final)
+ 80 µL d'échantillon (TMV ou contrôle)
La calibration de l'appareil s'effectue pour chaque échantillon par addition de 20 µL de calibrant.
La plaque est insérée dans l'appareil.
La réaction de coagulation est déclenchée par ajout de 20 µL d'une solution diluée du substrat fluorescent (2,4 mM final) dans le tampon calcium et distribué par l'appareil.

La fluorescence du à la libération du fluorophore AMC (7-amino-4-methylcoumarin) est mesurée toutes les 30 secondes à la longueur d'onde d'excitation de 390 nm et une longueur d'onde d'émission de 460 nm et enregistrée pendant 90 minutes.
La conversion des unités de fluorescence en concentration molaire de thrombine générée est effectuée par le logiciel Thrombinoscope® par comparaison avec la gamme de calibrant.
Le temps de latence, le pic et l'aire en dessous de la courbe ou ETP (Endogenous Thrombin Potential) sont également calculés par ce logiciel (Cf. figure 87).

Le calibrant sert à corriger les effets de consommation du substrat et de filtre interne ainsi que l'influence de facteurs optiques intrinsèques au plasma (couleur), de l'appareillage et des consommables.

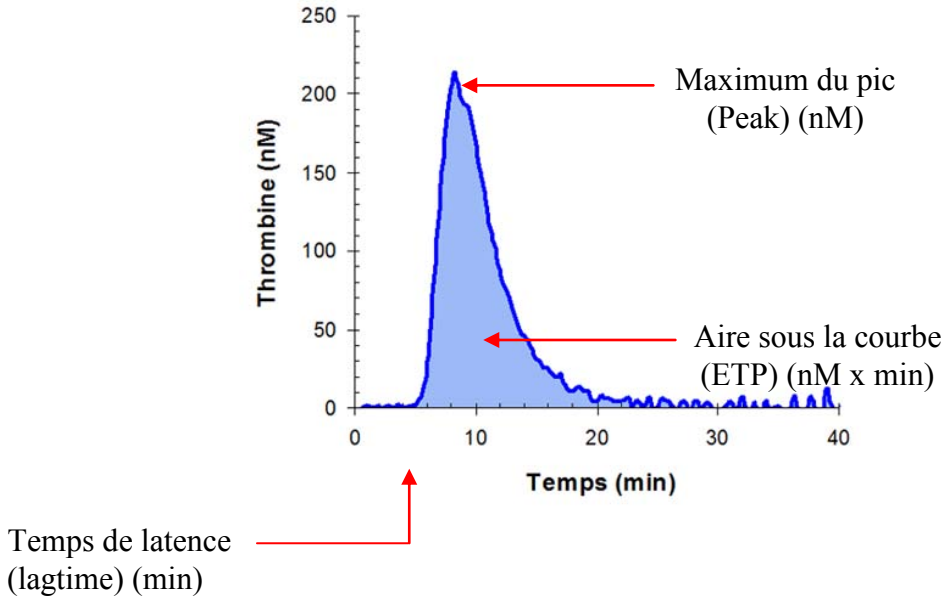


Figure 87 : Exemple d'un thrombinogramme obtenu lors de l'analyse des milieux conditionnés : représentation des différents paramètres calculés par le logiciel : temps de latence (Lagtime), valeur de concentration maximale de thrombine (Peak) et l'aire sous la courbe (ETP, endogenous thrombin potential).

II.10. Mesure de l'agrégation plaquettaire :

II.10.a. **Principe :**

L'agrégation plaquettaire constitue la première étape de l'hémostase, étape de coagulation du sang induite lors d'une lésion. Une fois activées, les plaquettes changent de forme et s'agrègent pour former le thrombus permettant de combler la brèche et permet de limiter les pertes sanguines. Les plaquettes possèdent le récepteur de l'ADP et du collagène et sont ainsi

capable de s'agréger en présence d'agonistes. La taille du caillot augmente au fur et à mesure que les autres plaquettes présent dans la suspension s'activent et viennent s'ajouter au système. Lorsque l'on mesure la transmission de la lumière à travers un échantillon, celle-ci augmente grâce à la clarification du milieu accompagnant l'agrégation des plaquettes.
Ce test fonctionnel est effectué en routine par le service hématologie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Nancy Brabois et sert à dépister des problèmes lié à la coagulation.

II.10.b. **Protocole :**

Le sang de volontaires sains est prélevé au niveau de la veine du pli du coude dans des tubes contenant du citrate 0.109 M (1/9 vol/vol) comme anticoagulant.
Le sang est ensuite centrifugé à 350 g pendant 10 minutes à + 20°C, de PRP est récupéré.
Le plasma restant est ensuite centrifugé à 2500 g pendant 15 minutes à + 20°C pour préparer le PPP.
Une numération plaquettaire est réalisé sur le PRP est le nombre de plaquette est ajusté à 300 G/L avec le PPP.
Le PRP est ensuite mis à incuber 10 minutes à + 37°C en présence de la molécule à tester à différentes concentration sous agitation magnétique. Un tube contrôle est réalisé avec PBS.
L'ajout de l'agoniste (2,5 ; 5 et 10 µM d'ADP ou 2 et 10 µg/mL de collagène) permet le déclenchement de la réaction.
L'appareil mesure la transmission de la lumière jusqu'à l'obtention d'une agrégation complète et définitive et donne les résultats sous forme de pourcentage d'agrégation en fonction du temps

Une inhibition de l'agrégation se traduit généralement par un allongement du temps de latence ou de l'agrégation maximale. De plus, l'agrégation peut également devenir réversible c'est-à-dire que le pourcentage d'agrégation diminue par manque d'activation suffisante des plaquettes.

II.11. Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés par la moyenne ± déviation standard (SD) pour chaque milieu étudié, excepté pour les expériences de western blot où la l'erreur standard (SEM) a été utilisée.

Une analyse de la variance (Anova) a été réalisée avec comparaison des échantillons par un test de Bonferroni/Dunn (Statview® software 5.0, Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) excepté pour les expériences de western blot où le test à posteriori de PLSD Fisher a été utilisé. Les valeurs de probabilité (p) inférieures à 0,05 % ont été considérées comme statistiquement significatives.

Partie 2 :

Résultats

Les travaux de ma thèse avaient pour but d'étudier l'effet de thérapies ciblées anti-EGFR, telles que le cetuximab, sur l'angiogenèse ; le cetuximab étant déclaré dans le résumé des caratéristiques du produit (RCP) comme anti-angiogénique du fait de sa capacité à diminuer la synthèse tumorale de VEGF. Nous nous sommes donc intéressés aux anticorps monoclonaux utilisés en clinique comme le cetuximab. Nous avons également commencé une étude avec le panitumumab en cours d'essai clinique en Espagne pour le traitement des cancers des VADS. Par ailleurs, nous avons été sollicités durant ma thèse pour évaluer l'efficacité d'un agent anti-angiogénique ciblant le récepteur au facteur de croissance endothélial VEGFR-2. L'évaluation des effets d'une telle molécule ciblant directement les cellules endothéliales nous a paru complémentaire à nos objectifs initiaux et c'est la raison pour laquelle nous avons accepté d'effectuer cette étude.

Nous présenterons tout d'abord dans une première partie les résultats des travaux sur les anti-VEGFR-2 puis, dans une seconde partie, ceux sur les anti-EGFR. Enfin une troisième partie sera consacrée à l'influence du cetuximab sur le relargage des microvésicules, nouveaux vecteurs de communication cellulaire.

Chapitre 1 : Evaluation *in vitro* de nouvelles molécules anti-angiogénique ciblant VEGFR-2

Le but de cette partie est donc d'évaluer l'efficacité *in vitro* d'un nouveau candidat thérapeutique anti-angiogénique ciblant VEGFR-2

Nous avons travaillé en collaboration avec M. Enrico Perspicace, doctorant en chimie et sa directrice le Dr. Stéphanie Hesse au sein du laboratoire LIMBP du Pr. G. Hirsch de l'université Paul Verlaine de Metz. L'objectif de leurs travaux de recherche était de synthétiser des nouvelles molécules ciblant VEGFR-2. A l'aide d'un logiciel informatique, ils ont modélisé le récepteur et déterminé la structure de molécules pouvant entrer dans la poche de liaison à l'ATP et ainsi inhiber l'activation de ce récepteur. Puis, ils ont effectué la synthèse de différents composés et réalisé des tests d'activité en solution, *in vitro*, de ces molécules. Enfin, ils nous ont sollicités pour confirmer l'efficacité des molécules retenues sur l'activité des cellules endothéliales en culture (HUVEC). Ce travail fait l'objet d'une publication en cours d'écriture.

Les différentes molécules retenues ciblant VEGFR-2 sont des petits composés synthétiques à base de noyau pyrimidine, structure de base des nucléosides triphosphates (ou nucléotides). Ainsi, en mimant la structure de l'ATP, ces petites molécules sont capables de s'insérer dans la poche de liaison à l'ATP du récepteur VEGFR-2. Elles empêchent donc la phosphorylation du récepteur induite par la fixation du ligand et l'activation des voies de signalisation subséquentes. Plusieurs formes ont été synthétisées par M. Enrico Perspicace et les tests d'activité *in vitro* ont montré une activité plus forte pour le composé thiénopyrimidinone codifié dans la suite de ce document par EPS4 (Cf. structure dans le chapitre matériel et méthode § I.3.a).

Les premières molécules fournies par les chimistes étaient solubles dans le diméthylsulfoxide (DMSO), solvant toxique pour les HUVEC. De plus, certaines molécules cristallisaient lorsqu'elles étaient diluées dans le milieu de culture des cellules endothéliales ; ces molécules n'ont donc pas pu être testées. C'est pourquoi, nous avons imposé, à nos collègues chimistes de produire ces molécules sous forme de sels. Les formes salines synthétisées n'étaient pas toutes compatibles avec les milieux de culture à pH physiologique et nous avons du réfuter toutes les molécules proposées en sels de chlorhydrate (HCl), de méthylsulfonate et de phosphate (H_3PO_4) totalement insolubles dans ces milieux. Seule, la forme tartrate du thiénopyrimidinone est soluble dans les milieux physiologiques et a pu être retenue et testée. Les résultats présentés dans ce chapitre sont uniquement ceux obtenus avec cette molécule.

Ainsi, l'effet de la molécule EPS4 a été évalué sur la prolifération des cellules endothéliales et la formation de structures pseudo-capillaires *in vitro*.

I. Effet sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC :

L'effet de l'EPS4 sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC ont été testés après 24 heures de culture en présence ou en absence d'un apport exogène de VEGF.

Les essais préliminaires réalisés avec des molécules anti-angiogéniques potentielles ont montré une forte activité anti-métabolique sur les HUVEC dès 24 heures d'incubation ; nous avons donc fixé ce temps d'incubation de 24 heures pour réaliser nos différents tests.

Dans un premier temps nous avons testé l'effet de différentes concentrations de VEGF sur l'activité métabolique des HUVEC afin de déterminer celle à utiliser par la suite pour tester l'efficacité d'EPS4 (Cf. figure 88).
Après 24 heures d'incubation, l'activité métabolique des HUVEC est peu modifiée en présence de VEGF, quelle que soit la concentration utilisée. En effet, ces cellules ont un temps de doublement de 21 heures (Cf. partie matériel et méthode II.3.b.5) et l'effet mitogène du VEGF ne peut-être détecté qu'après au moins deux cycles cellulaires (soit 42 heures). Or, l'effet obtenu avec ces agents anti-VEGFR-2 lors de l'analyse des premières molécules

synthétisées a montré une forte inhibition de l'activité métabolique des HUVEC dès 24 heures, c'est pourquoi nous avons poursuivi notre étude et évalué l'effet d'EPS4 après 24 heures d'incubation.

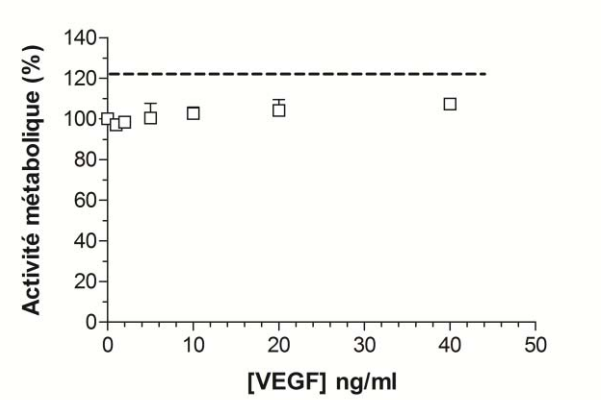


Figure 88 : Effet de VEGF sur l'activité métabolique des HUVEC : les cellules ont été cultivées pendant 24 heures dans milieu de culture contenant 2% de SVF et différentes concentrations de VEGF. La ligne discontinue représente l'activité métabolique des HUVEC cultivées en milieu de culture complet contenant 20 % sérum humain AB (n=2, triplicat).

Ainsi, pour réaliser l'étude de l'efficacité d'EPS4, nous avons choisi d'utiliser 10 ng/mL de VEGF, concentration généralement utilisée par les auteurs et supérieure à la concentration correspondant à la dose de demi-efficacité (ED50) fournie par le fabriquant (1 à 6 ng/ml).

L'effet d'EPS4 sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC ont été évalués avec des concentrations comprises entre 0 et 100 µM, les résultats sont présentés dans la figure 89.
EPS4 induit une diminution significative de l'activité métabolique des HUVEC dès 1,5 µM, diminution proportionelle à la dose. L'activité obtenue est la même en présence et en absence de ce facteur de croissance (- 51 % dans les deux cas à 100 µM d'EPS4). La concentration calculée correspondant à une activité métabolique diminuée de moitié (ou concentration de demi-inhibition, IC_{50}) est de 12 µM si on considère que l'effet maximal est obtenu à 100 µM. Il reste à tester des concentrations plus élevées pour s'en assurer.
Il est important de noter qu'EPS4 ne présente aucun effet significatif sur la viabilité des HUVEC après 24 heures de culture. Il sera intéressant d'évaluer cet effet sur des temps plus longs d'exposition afin de préciser l'effet d'EPS4 sur la viabilité des cellules endothéliales.

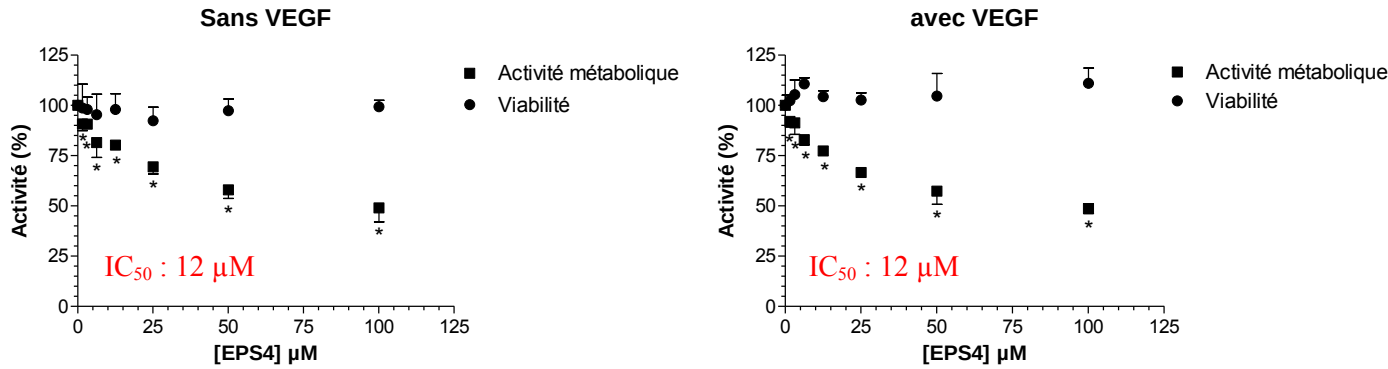


Figure 89 : Etude de l'effet du tartrate de thiénopyrimidinone (EPS4) sur les HUVEC : mesure de l'activité métabolique (carré noir) et de la viabilité (rond noir) des HUVEC en présence (à droite) et en absence (à gauche) de VEGF après 24 heures de culture (n=3, triplicat, $p<0,05$, * versus milieu sans EPS4).

Ainsi, quelle que soit la concentration utilisée, EPS4 réduit significativement l'activité métabolique des HUVEC après 24 heures d'exposition sans être cytotoxique ; son action est donc plutôt cytostatique. L'effet d'EPS4 sur l'activité angiogénique des HUVEC a ensuite été étudié.

II. Effet sur la formation de tubes pseudo-capillaires :

L'activité angiogenique d'EPS4 a été évaluée dans un modèle *in vitro* de culture des cellules HUVEC sur matrice (Matrigel®) après 24 heures d'exposition en présence ou en absence de VEGF. Les réseaux sont visualisés après marquage des cellules avec la phalloïdine-SR (Cf. figure 90).

Le VEGF stimule à lui seul la formation de tubes pseudo-capillaires par les HUVEC et sert ainsi de contrôle positif. En absence de VEGF, les HUVEC forment un réseau de tubes pseudo-capillaires beaucoup moins développé et possédant de grandes plages où les cellules forment plutôt une monocouche de cellules jointives.
Les tests réalisés avec EPS4 montrent une forte inhibition de la formation de ces tubes pseudo-capillaires dès la première concentration testée (3 µM) et ce, quelle que soit la présence de VEGF.

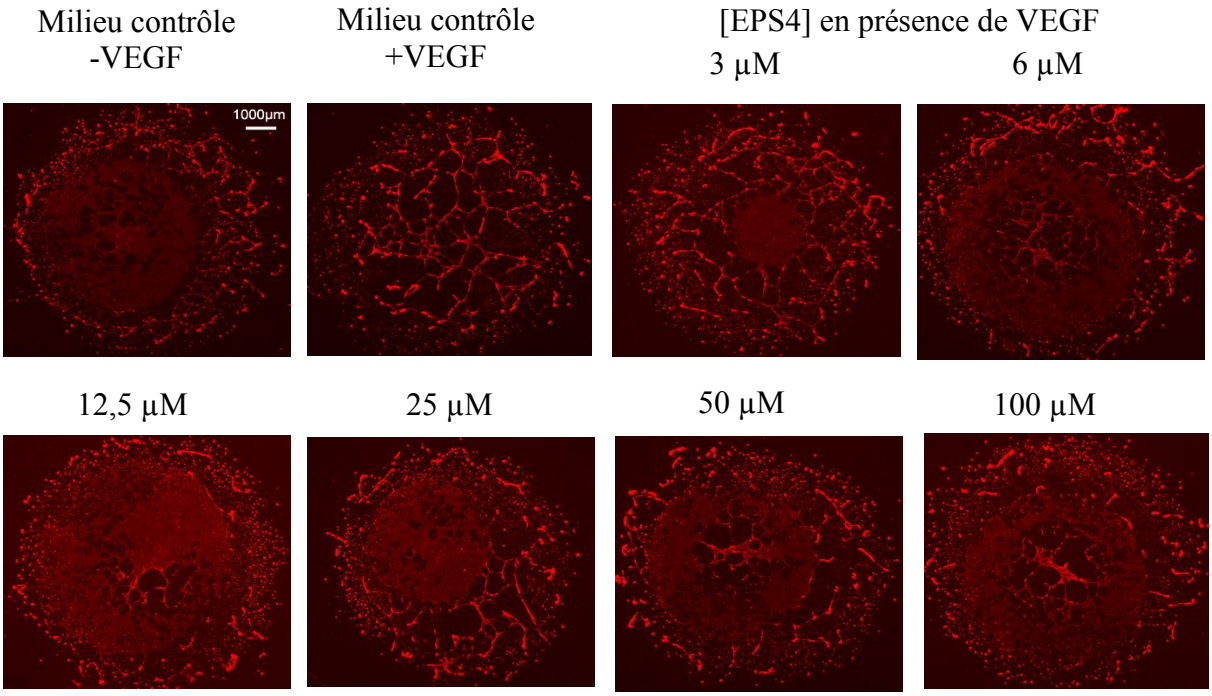


Figure 90 : Effet d'EPS4 sur la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro* induite par le VEGF. Les cellules HUVEC ont été cultivées sur matrigel en présence de 10 ng/mL de VEGF et de 0 à 100 µM d'EPS4 pendant 24 heures. Le réseau de tubes pseudo-capillaire a été observé par microscopie de fluorescence après marquage des cellules avec la phalloïdine-SR (rouge). (n=2 en duplicat, barre d'échelle = 1000 µm).

La densité de l'ensemble du réseau pseudo-capillaire a été quantifiée à partir des images obtenues par microscopie de fluorescence à l'aide du logiciel NIS-Elément et représente la surface occupée par les tubes pseudo-capillaires par rapport à la surface totale du champ observé.

Comme on peut le voir sur la figure 91 ci-après, lorsque les HUVEC sont cultivées en présence de VEGF, la densité du réseau est réduite de 60% vraisemblablement parce que les cellules s'organisent en un réseau composé par de fines structures pseudo-capillaires. Lorsque l'on ajoute de l'EPS4, cette densité, malgré la présence de VEGF, est comparable à celle obtenue sans VEGF. Cette absence de formation de réseau pseudo-capillaire traduit l'effet inhibiteur de la molécule EPS4 sur l'angiogenèse induite par le VEGF. De plus, cet effet anti-angiogénique est obtenu quelle que soit la concentration en EPS4 utilisée (jusqu'à 100 µM). Pour préciser et quantifier cet effet, nous n'avons pas pu utiliser le logiciel AngioSys comme pour la suite du travail. En effet, les plages de cellules jointives interfèrent avec l'établissement du squelette correspondant au réseau endothélial et faussent ainsi les calculs du nombre de jonction et de la longueur des tubes pseudo-capillaires. Nous développons en

collaboration avec le CRAN (UMR CNRS 7039, Dr. Th. Bastogne et H.El Djermoun) une méthode de traitement d'image permettant de prendre en compte l'existence de ces plages cellulaires.

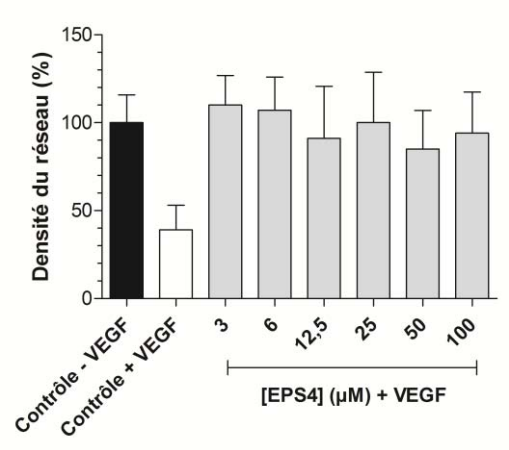


Figure 91 : Effet d'EPS4 sur la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro* induite par le VEGF. Les cellules HUVEC ont été cultivées sur matrigel dans du milieu de culture contenant 2 % de SVF (noir) ou additionné de 10 ng/mL de VEGF (blanc) et d'EPS4 (3-100 µM) (gris) pendant 24 heures. La densité du réseau formé par les tubes pseudo-capillaires a été quantifiée à partir des images prises par microscopie de fluorescence à l'aide du logiciel NIS Element. (n=2).

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent qu'EPS4 apparaît être un candidat potentiel anti-angiogénique ayant une activité anti-métabolique et anti-angiogénique sans effet cytotoxique notable sur les cellules endothéliales.

III. Effet sur l'agrégation plaquettaire :

Les patients atteints de cancer ont un risque élevé de développer des événements thrombo-emboliques. De plus, certains agents thérapeutiques anti-VEGFR-2 utilisés en clinique présentent comme effet indésirable une augmentation du risque d'événements thrombo-emboliques comme le sorafenib et le sunitinib (risque d'infarctus du myocarde, de thrombose…) (247). Ainsi il semble important d'étudier, parallèlement à la mise au point de nouvelles molécules, les effets indésirables potentiellement rédhibitoires pour l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché pharmaceutique.
Ainsi, dans ce paragraphe, nous avons cherché à connaître l'effet de notre candidat anti-angiogénique sur l'agrégation plaquettaire.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Julien Perrin, assistant hospitalo-universitaire dans le service d'hématologie biologique du Pr. Th. Lecompte du CHU-Nancy

Brabois. Ce test permet d'étudier la réponse plaquettaire en présence d'agonistes de différents récepteurs impliqués dans l'activation de leur l'agrégation. Nous avons choisi d'utiliser l'ADP et le collagène car ce sont deux agonistes plaquettaires majeurs mettant en jeu des voies d'activation distinctes.

Lorsque l'on ajoute de l'ADP exogène à un plasma riche en plaquettes, celles-ci s'agrègent. L'appareil mesure la lumière diffusée à travers l'échantillon et la convertit directement en pourcentage d'agrégation. Lors de l'ajout de l'ADP, et selon la concentration utilisée, un temps de latence assez court est nécessaire pour déclencher l'activation des plaquettes puis l'agrégation augmente de façon exponentielle jusqu'à atteindre un maximum.

Une inhibition de l'agrégation plaquettaire se traduit en général par un allongement du temps de latence ou un allongement de l'agrégation maximale. Mais l'agrégation peut également être réversible c'est-à-dire que le pourcentage d'agrégation peut diminuer au cours du temps par une faiblesse dans l'activation des plaquettes.

Dans une première approche, la molécule EPS4 n'a montré aucun effet sur la fonctionnalité plaquettaire en plasma riche en plaquette citraté (PRP). Les essais réalisés avec une gamme de concentration en EPS4 (entre 12,5 µM et 100 µM) ne montrent aucun effet significatif sur l'agrégation des plaquettes induite par l'ADP (Cf. figure 92 ci-dessous).

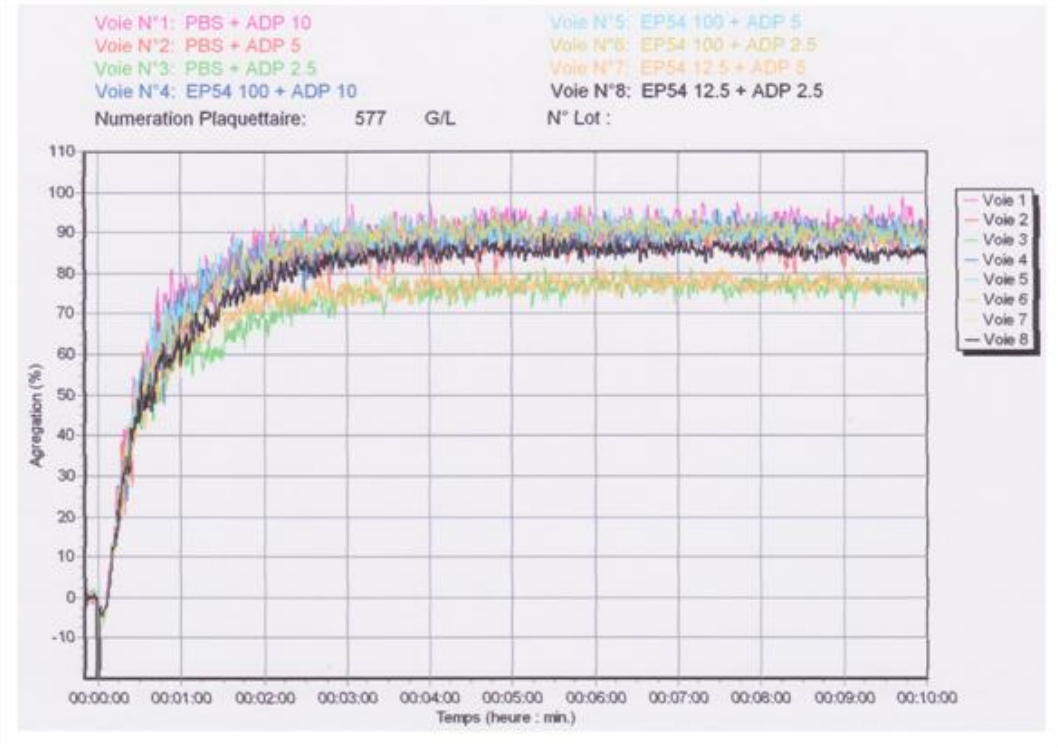


Figure 92 : Exemple de la cinétique de l'agrégation des plaquettes induite par l'ADP en présence d'EPS4 : l'agrégation des plaquettes a été déclenchée avec de l'ADP (2,5 ; 5 et 10 µM) en présence ou en absence d'EPS4 (12,5 et 100 µM).

De même, EPS4 n'a aucun effet significatif sur l'agrégation des plaquettes induite par le collagène (Cf. figure 93), quelque soit la concentration en agoniste utilisée.

De plus, la molécule seule, en l'absence d'agoniste n'a pas déclenché une agrégation plaquettaire.

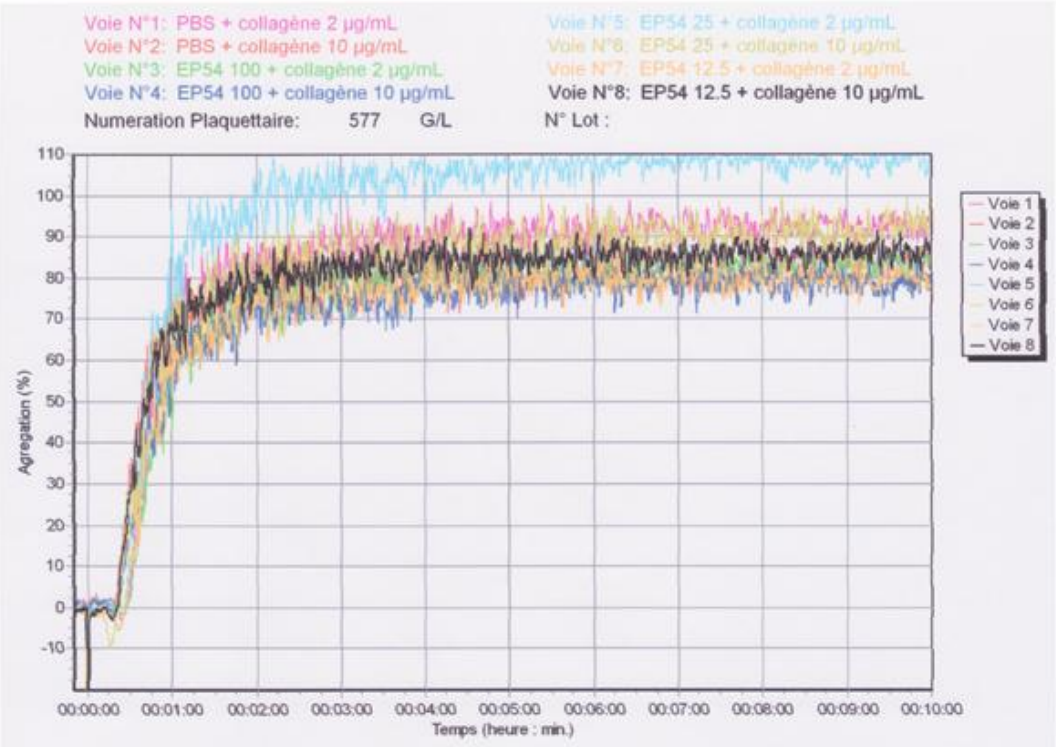


Figure 93 : Exemple d'agrégation des plaquettes induite par le collagène en présence d'EPS4 : l'agrégation des plaquettes a été déclenchée avec du collagène (2 et 10 µg/mL) en présence ou en absence d'EPS4 (12,5 et 100 µM).

Ces résultats ne montrent pas d'activité directe d'EPS4 sur l'agrégation plaquettaire.

Cependant la structure de la molécule ESP4 étant une thiénopyrimidinone, elle présente certaines homologies avec la structure thiénopyrimidine de certains anti-agrégants plaquettaires. Nous pensons que les métabolites hépatiques d'EPS4 seraient peut-être capables d'avoir une action anti-agrégante sur les plaquettes et pourraient ainsi apporter un bénéfice dans les traitements des pathologies cancéreuses. Nous prévoyons de vérifier cet effet chez la souris.

IV. Discussion :

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet biologique d'un agent thérapeutique potentiel anti-angiogénique ciblant VEGFR-2, la thiénopyrimidinone ou EPS4, sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vitro*.
Le travail de thèse du Dr. Enrico Perspicace a permis d'élaborer un programme informatique 3D-QSAR permettant de modéliser les structures tridimensionnelles des molécules et d'évaluer leur capacité à entrer en compétition avec l'ATP pour bloquer l'activation de VEGFR-2. Différentes molécules potentielles ont été synthétisées et leur activité a été testée *in vitro*.

L'activité biologique du tartrate de thiénopyrimidinone a été évaluée dans un modèle de culture *in vitro* de cellules endothéliales. EPS4 est capable d'inhiber l'activité métabolique des HUVEC, et ce, malgré la présence de VEGF avec une concentration de demi-activité biologique ou IC_{50} de 12 µM. Cette valeur est supérieure à celle trouvée *in vitro* par les chimistes, qui, par mesure de l'activité enzymatique du récepteur VEGFR-2 en présence d'EPS4 dans un test de compétition avec l'ATP, avait défini l'IC_{50} à 2,25 µM (Pr. R. Ragno, Université La Sapienza de Rome, Italie). Cependant, l'activité anti-angiogénique de cette molécule dans un modèle de culture de cellules sur matrice semble supérieure puisque l'effet maximal est atteint dès la première concentration testée c'est-à-dire 3 µM. Ainsi, le modèle 3DQSAR utilisé est bien prédictif de l'efficacité des molécules sur notre modèle d'angiogenèse *in vitro*. Cette activité est proche de celle du sorafenib, molécule utilisée en clinique pour le traitement de carcinomes avec une IC_{50} de 5 µM (248). Cependant, d'autres molécules utilisées en clinique ou en cours de développement présentent une concentration de demi-inhibition de l'activité métabolique des HUVEC située entre 0,67 nM et 0,16 µM (Cf. tableau 20 ci-après).

Le tartrate de thiénopyrimidinone semble donc moins actif que les molécules en cours d'essais. Des modifications sont envisagées afin de rendre le composé plus actif.
En effet, lorsque l'on regarde la conformation tridimensionnelle de cette molécule dans la poche de liaison à l'ATP de VEGFR-2 (Cf. figure 90), on s'aperçoit qu'un groupement benzyl sort de la poche (Cf. rond rouge figure 90). Les chimistes envisagent donc de remplacer ce groupement par un groupement moins encombrant comme un méthyle. De plus, toute la structure de la poche n'a pas été utilisée pour dessiner la structure de ce composé, il reste un

espace vide (Cf. double flèche rouge figure 94). Ainsi, en modifiant la structure du composé pour qu'il occupe tout l'espace, ils peuvent peut-être augmenter son affinité pour le récepteur. De nouvelles simulations doivent ainsi être effectuées avec le modèle informatique 3D-QSAR afin de savoir si les modifications envisagées sont susceptibles d'améliorer l'IC_{50}, ceci avant de se lancer dans une nouvelle synthèse. Cependant, EPS4 n'affecte pas la viabilité des HUVEC et peut, par ce fait, avoir un mécanisme d'action intéressant. Augmenter son IC_{50} pourrait peut-être éliminer cette caractéristique et rendre le composé plus toxique avec de nombreux effets secondaires.

Nom de la molécule	**IC 50 (µM)**	**Références**
YN968D1	0,17 µM	(249)
AEE-788	0,16 µM	(250)
vandetanib	60 nM	(251)
BAY-579352	26 nM	(252)
pazopanib (votrient)	21 nM	Agence européeenne d'évaluation Procedure No. EMEA/H/C/001141
Sunitinib (SU-11248, Sutent)	0,01 µM	(253)
AMG-706	10 nM	(254)
BIBF-1120	10 nM	(255)
AZD-2171	0,4 nM / 4 nM	(256) / (252)
E7080	2,7 nM	(257)
KRN-951	0,67 nM	(258)

Tableau 20 : Exemple d'IC50 obtenues pour quelques molécules ciblant le domaine tyrosine kinase de VEGFR-2 : d'après des tests effectués sur l'activité métabolique ou la prolifération des HUVEC.

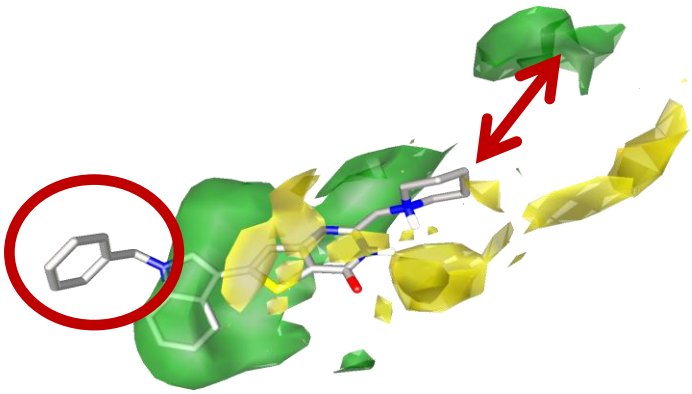


Figure 94 : Visualisation de la thiénopyrimidinone dans la carte des interactions moléculaires avec le domaine de liaison à l'ATP de VEGFR-2 (modèle 3B-QSAR). *(Extrait de la Thèse M. Perspicace du 5 Oct 2010, Université Paul Verlaine Metz).* En vert, les interactions positives, en jaune, les interactions interdites pour obtenir une bonne interaction entre le composé et le récepteur et ainsi une meilleure inhibition de VEGFR-2.

La viabilité des cellules endothéliales n'est pas modifiée par EPS4, ce qui suggère un effet cytostatique de cette molécule. Une véritable étude de la prolifération des cellules endothéliales cultivées en présence d'EPS4 pendant plusieurs jours permettra de juger de la réelle toxicité mais également d'évaluer l'effet anti-mitotique de cette molécule. La comparaison de l'effet d'EPS4 vis-à-vis d'autres molécules sélectionnées par leur l'IC_{50} nous permettra de positionner l'activité anti-angiogénique de notre molécule par rapport aux autres molécules en cours de développement. Enfin, EPS4 ne montre pas d'effet pro-agrégant. Ceci est un point positif pour ce potentiel agent thérapeutique compte tenu de l'état thrombotique des patients atteints de cancer. Un effet anti-agrégant aurait été un réel bénéfice par rapport à ses concurrents. En effet, il a été montré que les traitements comme le sorafetinib et le sunitinib étaient associés à une augmentation significative du risque d'événements thromboemboliques artériels (247). Seulement, nous avons regardé uniquement l'hémostase primaire et une étude approfondie doit être réalisée afin d'évaluer, dans sa globalité, l'effet de cette molécule sur la coagulation sanguine.

Dans la mesure où cette molécule sera retenue pour un développement plus important, des études permettant d'évaluer l'efficacité de la molécule sur d'autres activités cellulaires impliquées dans l'angiogenèse comme la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules endothéliales, doivent être envisagées.

L'état de phosphorylation du récepteur VEGFR-2 devra également être étudié pour confirmer l'inhibition de son activation par EPS4. Les molécules inhibant l'activité tyrosine kinase ne sont généralement pas spécifiques d'un seul récepteur mais sont capables de bloquer l'activation d'autres récepteurs (Cf. tableau 13). Ainsi, l'état de phosphorylation des différents récepteurs à activité tyrosine kinase devra également être analysé afin d'évaluer la spécificité de notre nouvelle molécule. De plus, certains récepteurs à activité tyrosine kinase sont également exprimés par les cellules tumorales et certaines molécules comme le sorafenib sont capables d'induire une diminution de l'activité métabolique de différentes lignées tumorales (248) ; alors que d'autres comme le pazopanib, par exemple, n'en sont apparemment pas capables (european medecine agency, EMA/CHMP/248579/2010). Ainsi, l'efficacité d'EPS4 sur la prolifération et la viabilité de nos lignées cellulaires tumorales devront également être définies.

En utilisant un modèle *in vitro* de cellules endothéliales cultivées sur une matrice, nous avons montré qu'EPS4 était capable d'inhiber la formation de structures pseudo-capillaires induite par le VEGF. Cette activité demande à être confirmée par l'utilisation d'un modèle

d'angiogenèse plus complexe (259) comme celui de la culture d'anneau aortique utilisé pour tester le YN968D1 (249) ou celui de l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de fenêtre dorsale.

Chapitre 2 : Evaluation *in vitro* des anticorps ciblant EGFR

Le but de cette partie est d'évaluer les effets indirects des agents ciblant EGFR sur l'angiogenèse induite par les cellules tumorales issues de carcinomes des VADS.

EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase surexprimé dans la plupart des tumeurs solides et représente une cible de choix pour les nouvelles thérapies dites ciblées. Le développement des thérapies anti-EGFR a conduit à la mise sur le marché de plusieurs types d'inhibiteurs : les inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase qui ciblent le domaine intracellulaire comme le gefitinib et les anticorps ciblant le domaine extracellulaire du récepteur comme le cetuximab (anticorps chimérique homme souris) et le panitumumab (anticorps complètement humanisé).

Ces agents thérapeutiques sont décrits comme des agents cytostatiques pouvant bloquer le cycle cellulaire en phase G0/G1 des cellules tumorales et diminuent ainsi leur prolifération. Ils sont également connus pour diminuer la sécrétion de divers facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le FGF-2 ou l'IL-8 (124, 260-262). Ainsi, une activité anti-angiogénique indirecte, via les cellules tumorales, a été attribuée à ces médicaments mais sans l'avoir vérifié sur les cellules endothéliales, siège de l'activité angiogénique.

L'expression du récepteur EGFR par les cellules endothéliales, et plus précisément par les HUVEC, n'est pas clairement établie: Certains auteurs ont démontré sa présence (129, 263) alors que d'autres ne l'ont pas détecté (130, 207, 264-265). Cependant, il a été montré que le gefitinib est capable de diminuer la migration et la formation de tubes par action directe sur les cellules endothéliales (263, 266). Par ailleurs, les cellules endothéliales tumorales sont capables de surexprimer EGFR (130, 207) et peuvent répondre aux traitements anti-EGFR.

De plus, un des mécanismes de résistance possibles aux agents anti-EGFR pourrait être lié à une stimulation de l'angiogenèse tumorale (262), impliquant ainsi indirectement les cellules endothéliales.

L'activité des thérapies anti-EGFR sur l'angiogenèse n'est donc pas très claire et les agents ciblant le domaine extracellulaire d'EGFR peuvent peut-être avoir un effet direct sur l'activité des cellules endothéliales, en plus de leur effet indirect sur l'angiogenèse attribué à la diminution de facteurs pro-angiogéniques sécrétés par les cellules tumorales.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés spécifiquement aux anticorps ciblant EGFR tels que le cetuximab et le panitumumab dans un contexte de tumeurs des voies aérodigestives supérieures (VADS) et plus précisément de carcinomes épidermoïdes surexprimant EGFR.
Notre but était de définir l'impact réel de ces anticorps sur l'angiogenèse induite par ces cellules tumorales.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'efficacité du cetuximab sur l'activité métabolique de nos deux lignées tumorales issues de carcinomes des VADS (Cal27 et FaDu) et de cellules endothéliales extraites de la veine ombilicale humaine (HUVEC). Ces travaux nous ont permis de déterminer deux concentrations de médicament non cytotoxiques sur les HUVEC, concentrations utilisées ensuite pour évaluer l'impact de cette molécule sur l'angiogenèse.

Dans un deuxième temps, l'impact du cetuximab sur l'angiogenèse induite par les cellules tumorales a été évalué à l'aide de milieux conditionnés. En effet, les cellules tumorales sont capables d'envoyer des signaux moléculaires afin de modifier le phénotype des cellules endothéliales et de favoriser l'angiogenèse tumorale. *In vitro*, ces signaux sont libérés dans le milieu de culture des cellules tumorales et peuvent ainsi être récupérés, c'est ce que l'on appelle communément les milieux conditionnés.

Une étude préalable réalisée au laboratoire a permis de déterminer le temps de culture nécessaire avant le recueil des milieux conditionnés. Les résultats ont montrés que les CM récupérés au bout de 24, 48 et 72 heures de culture des cellules Cal27 induisaient un effet similaire sur l'activité métabolique des HUVEC. De plus, une autre étude menée au laboratoire a montré que l'effet du cetuximab sur la prolifération des cellules tumorales était plus important après 48 heures d'exposition, par comparaison avec les résultats obtenus après

un temps d'exposition de 24 heures. Ainsi, nous avons choisi de récupérer les milieux conditionnés au bout de 48 heures de culture.

La composition de ces milieux conditionnés vis-à-vis de différentes protéines impliquées dans l'angiogenèse a été évaluée ainsi que leurs effets sur la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro*. L'effet indirect du cetuximab sur ces différentes activités a également été évalué par utilisation de milieux conditionnés récupérés après exposition des cellules tumorales à cet agent.

Enfin dans la dernière partie nous avons présenté les premiers résultats obtenus avec l'anticorps humanisé ciblant EGFR : le panitumumab. Ses effets sur la viabilité de nos lignées tumorales et des cellules endothéliales ont été évalués ainsi que sur la composition des milieux conditionnés vis-à-vis de certaines protéines impliquées dans l'angiogenèse.

I. Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des lignées cellulaires de cancer des VADS

I.1. Effet de la concentration en cetuximab

Les cellules tumorales ont été exposées à différentes concentrations de cetuximab et l'effet du médicament sur l'activité métabolique et la viabilité de ces cellules ont été évalués après 48 heures d'incubation. Les résultats sont donnés dans la figure 95.
Le cetuximab induit une diminution de 25 % de l'activité métabolique et de la viabilité des cellules Cal27 dès 2 µg/mL. Par contre, l'activité métabolique des cellules FaDu est diminuée de 25 % par le cetuximab mais pas leur viabilité, et ce, quelque soit la concentration utilisée. Ainsi, le cetuximab aurait un effet plutôt cytotoxique chez les cellules Cal27 et un effet plutôt cytostatique chez les cellules FaDu.

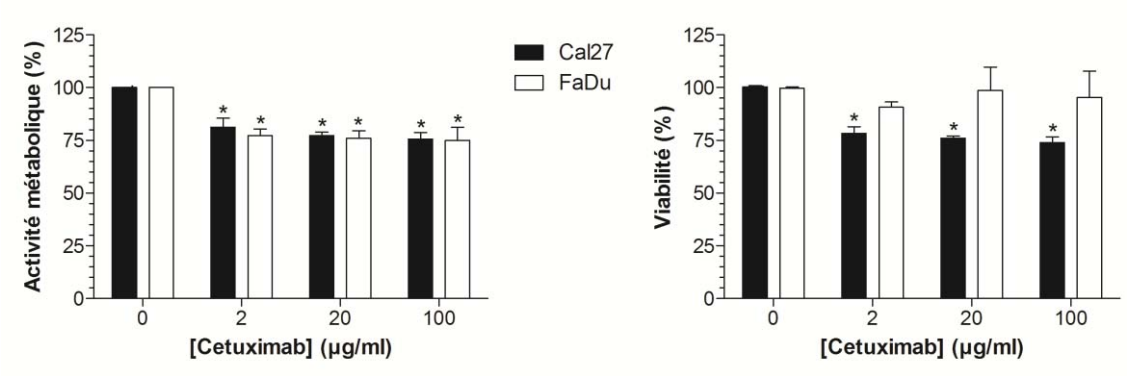


Figure 95 : Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules Cal27 et FaDu : mesure de l'activité métabolique (à gauche) et de la viabilité (à droite) des cellules Cal27 (en noir) et FaDu (en blanc) après 48 heures d'exposition au cetuximab (0-100 µg/mL). (n=3, $p<0,05$; * versus milieu sans cetuximab).

I.2. Influence de l'EGF sur la réponse des cellules tumorales au cetuximab :

Nous avons voulu vérifier si le cetuximab était capable de bloquer le signal induit par la fixation du ligand naturel du récepteur : EGF. Pour se faire, les cellules tumorales ont été exposées à différentes concentrations de ce médicament en présence de ce ligand. L'activité métabolique et la viabilité des cellules Cal27 et FaDu ont été évaluées après 48 heures d'incubation.

Comme on peut le voir sur la figure 96, le cetuximab diminue l'activité métabolique des Cal27 et des FaDu quelque soit la concentration d'EGF utilisée. La présence d'EGF seul augmente l'activité métabolique des Cal27 mais pas celles des FaDu. L'effet du cetuximab observé en présence d'EGF chez les Cal27 est supérieur à celui observé en absence d'EGF (- 41 % versus Ŕ 24 % d'inhibition de l'activité métabolique respectivement). Cependant, chez les FaDu, la plus forte concentration d'EGF (10 ng/mL) semble limiter l'effet induit par le cetuximab.

Le cetuximab diminue la viabilité des cellules Cal27 quelque soit la présence d'EGF ; avec cependant un effet beaucoup moins marqué en présence d'EGF (Cf. figure 97). En effet, pour de faibles concentrations en cetuximab (jusqu'à 20 µg/mL), la présence d'EGF permet de rétablir une viabilité normale alors que des concentrations plus élevées en médicament sont nécessaires pour diminuer la viabilité de ces cellules. Le cetuximab n'ayant pas d'effet sur la viabilité des FaDu, l'ajout d'EGF ne modifie pas la viabilité de ces cellules.

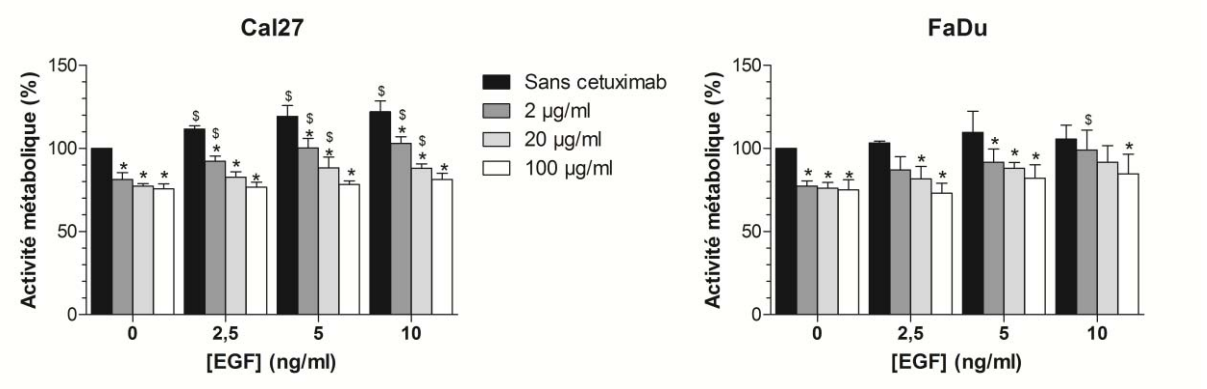


Figure 96 : Effet d'EGF sur l'activité métabolique des Cal27 et des FaDu en présence de cetuximab. Les cellules Cal27 (à gauche) et FaDu (à droite) ont été exposées à différentes concentrations de cetuximab (0-100 µg/ml) et d'EGF (0-10 ng/mL) pendant 48 heures avant de procéder à l'analyse de l'activité métabolique de ces cellules. (n=3, triplicat). P<0,05 ; * : versus même groupe sans cetuximab ; $: versus même groupe sans EGF).

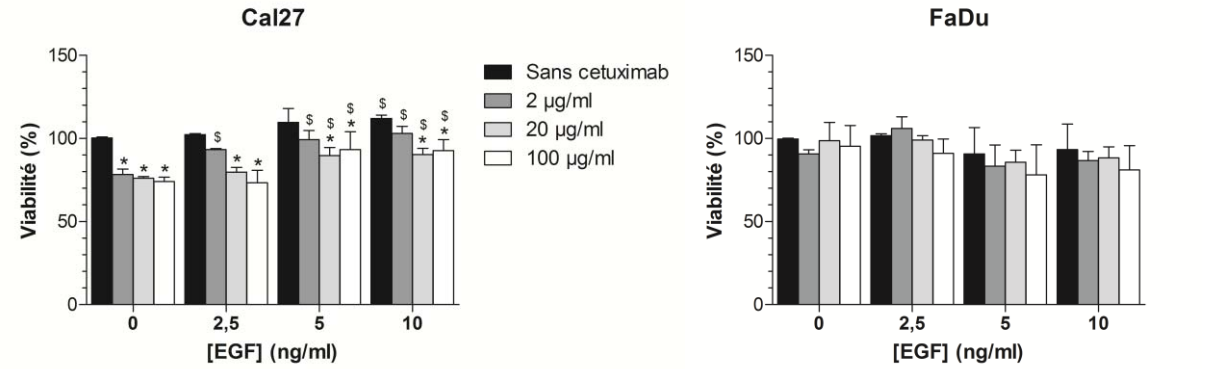


Figure 97 : Effet d'EGF sur la viabilité des cellules Cal27 et des FaDu en présence de cetuximab. Les cellules Cal27 (à gauche) et FaDu (à droite) ont été exposées à différentes concentrations de cetuximab (0-100 µg/ml) et d'EGF (0-10 ng/mL) pendant 48 heures avant de procéder à l'analyse de la viabilité de ces cellules. (N=3, triplicat ; P<0,05 ; * : versus même groupe sans cetuximab ; $: versus même groupe sans EGF).

Ainsi, l'effet du cetuximab est modulé par la présence d'EGF chez les cellules Cal27, le rendant plutôt cytostatique ; effet retrouvé chez les cellules FaDu en présence ou non d'EGF.
Seulement, nous avons voulu tirer bénéfice de cette différence de comportement des cellules Cal27 et FaDu vis-à-vis du traitement en absence d'EGF, différence nous permettant d'évaluer l'effet du cetuximab sur l'angiogenèse induite par deux lignées tumorales possédant différentes sensibilités vis-à-vis du cetuximab.

II. Effet direct du cetuximab sur la viabilité et l'activité métabolique des cellules endothéliales

Comme pour les lignées tumorales, les cellules endothéliales ont été exposées à différentes concentrations de cetuximab et l'activité de ce médicament sur la prolifération des cellules a été évaluée après 48 heures d'incubation. Les résultats sont présentés dans la figure 98.
Les faibles concentrations de cetuximab (2 et 10 µg/mL) n'ont aucun effet sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC. On observe une diminution significative de l'activité métabolique de ces cellules qu'à partir de 25 µg/mL de cetuximab (-23 %). Le cetuximab n'a aucun effet significatif sur la viabilité des HUVEC. Ainsi, le cetuximab agit sur les HUVEC mais à des doses supérieures à celles requises pour inhiber la prolifération des cellules tumorales. Cette diminution de l'activité métabolique des cellules endothéliales peut être due à l'interaction de l'agent thérapeutique avec le récepteur EGFR potentiellement présent à la surface des CE ou à un mécanisme non spécifique. Des expériences de liaison avec un anticorps marqué pourraient déterminer si le cetuximab est capable de se lier aux cellules endothéliales mais ceci n'a pas pu être réalisé dans le cadre de cette thèse.

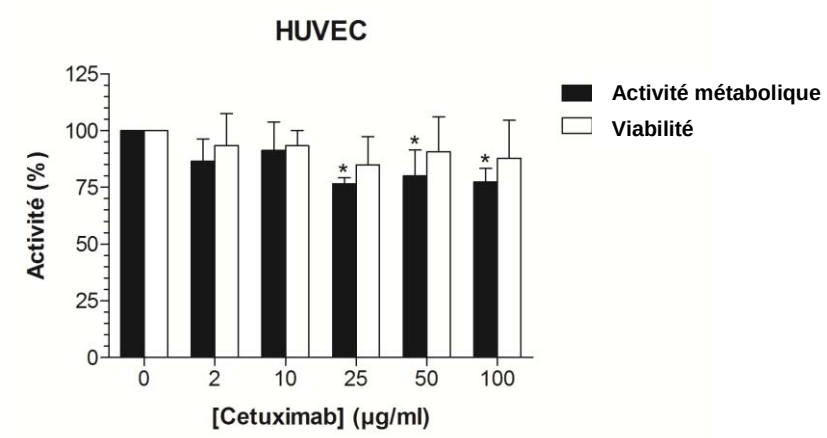


Figure 98 : Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales. Mesure de l'activité métabolique (MTT, en noir) et de la viabilité (Hoechst, en blanc) des HUVEC cultivées en présence ou en absence de cetuximab (0-100 µg/mL) pendant 48 heures. (n=3, $p<0,05$; * versus milieu sans cetuximab).

Ainsi, pour étudier les effets du cetuximab sur la libération des signaux permettant l'induction de l'angiogenèse, nous avons décidé de travailler avec deux concentrations de médicament n'affectant pas directement l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales : 2 et 20 µg/mL de cetuximab.

III. Effet du cetuximab sur la composition des milieux conditionnés :

La composition des milieux conditionnés (CM) vis-à-vis de nombreuses protéines solubles impliquées dans l'angiogenèse a été évaluée par une méthode semi-quantitative. Ainsi, nous avons pu observer les variations de la composition de ces milieux après exposition des cellules tumorales au cetuximab. Nous avons tenté de trouver, parmi ces signaux, des marqueurs impliqués dans l'angiogenèse permettant ainsi de prédire la réponse des cellules tumorales vis-à-vis des traitements et ayant une influence sur l'impact du cetuximab dans l'angiogenèse.

III.1. Dosage des protéines totales :

Lorsque les cellules prolifèrent, elles métabolisent les composés présents dans leur milieu de culture mais synthétisent et sécrètent également d'autres molécules dans leur milieu de culture. Nous avons donc essayé de quantifier la sécrétion des protéines par nos cellules tumorales en effectuant un dosage des protéines présentes dans les milieux conditionnés (Cf. figure 99).

Comme attendu, la quantité totale de protéines présentes dans les milieux augmente significativement après culture des cellules tumorales. Il n'y a pas de différence significative entre les deux lignées tumorales utilisées. L'exposition de ces lignées tumorales au cetuximab (2 et 20 µg/mL) n'a pas d'effet significatif sur la quantité de protéines totales retrouvées dans ces milieux conditionnés.

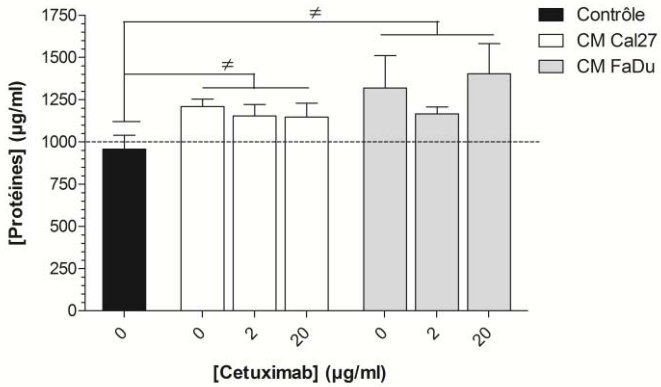


Figure 99 : Effet du cetuximab sur la sécrétion des protéines par les cellules tumorales : dosage des protéines totales dans le milieu contrôle (en noir) et dans les milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 (en blanc) ou FaDu (en noir) exposées ou non au cetuximab (n=3, duplicat, $p<0,05$; ≠ : versus milieu contrôle).

D'après la littérature, le cetuximab est capable de diminuer la sécrétion de VEGF ou d'IL-8 par les cellules tumorales. Nous avons donc poursuivi notre étude par une analyse plus fine des facteurs libérés dans les milieux conditionnés, comme le dosage du VEGF par la technique du Bioplex.

III.2. Dosage du VEGF :

Le dosage du VEGF a été réalisé par une méthode semi-quantitative et les résultats sont présentés dans la figure 100.

Dans des conditions normales de culture, les cellules Cal27 secrètent quatre fois plus de VEGF que les cellules FaDu. Comme attendu, le cetuximab induit une diminution dose-dépendante de la quantité de VEGF libérée dans les milieux conditionnés, et ce, quelle que soit la lignée utilisée (- 46 % et - 31 % à 20 µg/mL pour les Cal27 et FaDu respectivement).

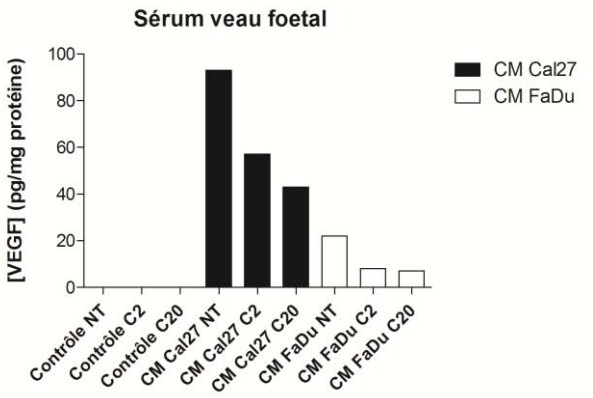


Figure 100 : Effet du cetuximab sur la libération de VEGF par les cellules tumorales : dosage par la technique Bioplex du VEGF dans les milieux conditionnés issus des cellules Cal27 (en noir) et des cellules FaDu (en blanc) exposées à 2 µg/ml (C2) ou 20 µg/ml (C20) de cetuximab pendant 48 heures.

Ainsi, nous avons pu retrouver, dans nos conditions expérimentales, l'effet du cetuximab sur la libération du VEGF par les lignées tumorales. Nous avons continué l'étude par l'analyse de l'expression d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse.

III.3. Evaluation des différents facteurs impliqués dans l'angiogenèse :

La sécrétion du VEGF étant diminué après exposition des cellules tumorales au cetuximab, nous avons voulu savoir si d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse étaient libérés dans les milieux conditionnés. Ceci a été réalisé par la technique des arrays permettant l'analyse de 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse dans un même échantillon. L'analyse a montré que les cellules Cal27 sécrètent une plus grande diversité de facteurs dans les milieux conditionnés comparativement aux FaDu (13 facteurs principaux versus 7 respectivement) (Cf. figure 101). Les analyses montrent également que le cetuximab induit une diminution à la fois des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, IL-8, uPA) et des facteurs anti-angiogéniques (TIMP, PAI-1) (Cf. tableau 21). Aucun facteur ne semble être un facteur clé et il est impossible de prédire l'effet résultant de ces milieux conditionnés sur l'angiogenèse.

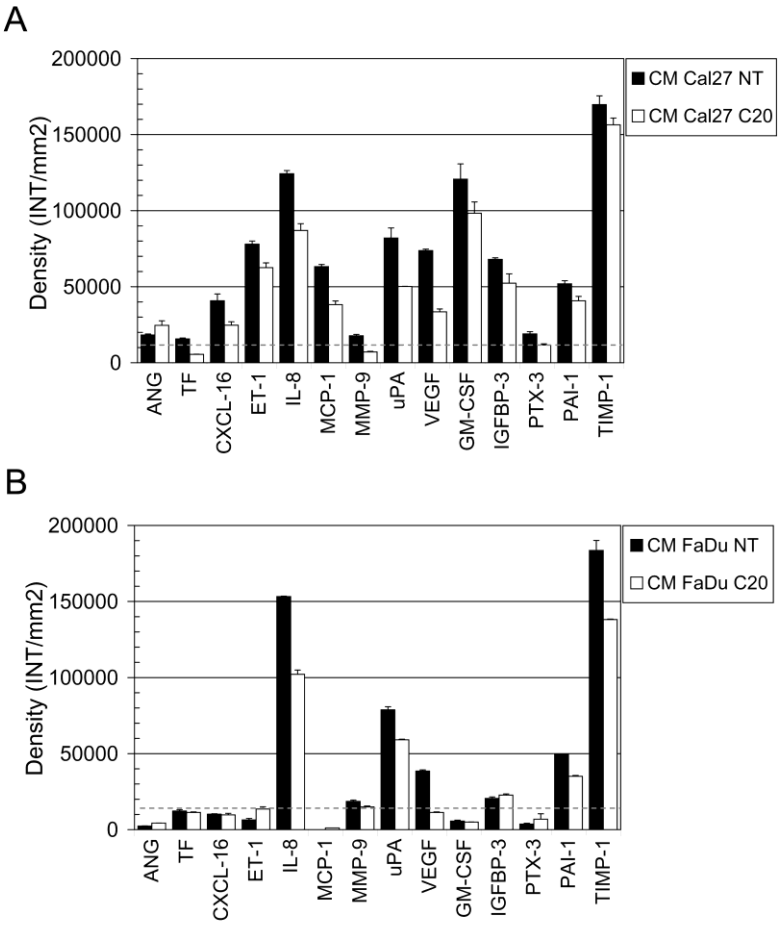


Figure 101 : Analyse de l'expression de protéines impliquées dans l'angiogenèse et libérées dans les milieux conditionnés : analyse des CM issus de la culture des cellules Cal27 (A) et des cellules FaDu (B) exposées (en blanc, C20) ou non (en noir, NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures.

Certaines protéines impliquées dans les processus angiogéniques sont considérées comme des facteurs de mauvais pronostic dans les tumeurs des VADS et sont retrouvés dans nos CM (Cf. tableau 21). C'est le cas du facteur PAI-1 impliqué dans la migration et l'invasion des cellules tumorales des carcinomes épidermoïdes des VADS (267) et retrouvé dans nos milieux. La libération de ce facteur anti-angiogénique par les cellules Cal27 et FaDu diminue sous l'effet des traitements anti-EGFR. Il en est de même pour le facteur TIMP-1, inhibiteur des métalloprotéases matricielles (268).
Outre son rôle au cours du développement et lors de la formation des organes glandulaires par tubulogenèse, l'amphiréguline (autre ligand d'EGFR) est également impliquée dans les processus conduisant à la prolifération des cellules tumorales dont l'angiogenèse (269). En effet, il a été montré que l'amphiréguline était un puissant mitogène pour les cellules musculaires vasculaires et que des anticorps neutralisants empêchaient la formation de tubes par les cellules endothéliales (270). L'amphiréguline a été faiblement détectée dans nos CM mais semble augmenter après exposition des cellules Cal27 au cetuximab; cependant son expression semble diminuer après exposition des celules FaDu.

D'autres protéines également impliquées à la fois dans l'angiogenèse et dans les cancers des VADS n'ont pas été détectées comme l'EGF, le FGF-2, le HGF, le NRG1- β1, l'IL-1β, la MMP-8, le PDGF-AB/BB, la Serpine-B5, la Serpine-F1, le TGF-β1 et le VEGF-C. En effet, certaines de ces molécules sont relarguées non pas par les cellules tumorales elles-mêmes mais par les cellules du microenvironnement tumoral. Ces molécules comme ADAMTS ou l'IL-1β ne peuvent donc pas être présentes dans nos milieux conditionnés.
Le facteur anti-angiogénique thrombospondine-1 (TSP-1) est impliqué dans la régulation de nombreuses fonctions dont la prolifération, la migration et l'apoptose. Il est régulé négativement dans les tumeurs VADS (271) et c'est pourquoi il n'a été retrouvé qu'en faible quantité dans nos milieux conditionnés. Le cetuximab n'a pas d'influence sur la sécrétion de TSP-1.

De plus, même si ces facteurs ont été retrouvés chez des patients atteints de tumeurs des VADS, ils ne sont jamais tous exprimés en même temps ; la diversité de ces facteurs dépend de la taille et du type de la tumeur. Le VEGF semble être commun à tous les individus, mais les autres sont surexprimés dans un certain nombre de cas. Ainsi le panel de facteur pro-angiogénique exprimé est différent pour chaque tumeur des VADS et reflète la différence d'expression observée par nos deux lignées Cal27 et FaDu.

Seuls le VEGF, l'IL-8, le TIMP-1, la MMP-9, le PAI-1, le FT et l'uPA semblent être communs à nos deux lignées tumorales et sont retrouvés dans les cancers des VADS (Cf. tableau 21) ; on retrouve également des différences de sécrétion et il en résulte une balance angiogénique complexe.

Nom du facteur	Activité pro-angiogénique (+) ou anti-angiogénique (-)	Présence dans les CM Cal27	Présence dans les CM FaDu	lien avec HNSCC
ADAMTS-1 ADAMs with TSP motifs	+	NON	NON	OUI
Angiogénine	+	OUI	±	OUI
Angiostatine/Plasminogène	-	NON	NON	?
Amphiréguline	+	±	±	OUI
CXCL-4 CXCL-16	-	NON OUI	NON ±	
EGF	+	NON	NON	OUI
HB-EGF	+	±	±	OUI
Endostatine	-	NON	NON	?
Endothéline-1 (ET-1)	+	OUI	±	OUI
FGF-2	+	NON	NON	OUI
FGF-1/ FGF-4/ FGF-7	+	NON NON NON	NON NON NON	? NON ?
GM-CSF	+	OUI	±	OUI
HGF		NON	NON	OUI
HRG-β1 (NRG1- β1)	+	NON	NON	OUI
IGFBP-1 IGFBP-2 IGFBP-3	-	+/- NON OUI	+/- NON OUI	? ? ?
IL-1β	+	NON	NON	OUI
IL-8	+	OUI	OUI	OUI
MCP-1	+	OUI	NON	OUI
MMP-8 MMP-9	+	NON OUI	NON OUI	OUI OUI
PDGF-AA PDGF-AB/BB	+	± NON	± NON	OUI OUI
PTX-3	+	OUI	±	OUI
Serpine-B5 (Maspin) PAI-1 (serpine-E1) Serpine-F1	-	NON OUI NON	NON OUI NON	OUI OUI OUI
TF	+	OUI	OUI	OUI
TGF-β1	+	NON	NON	OUI
TIMP-1 TIMP-4	-	OUI NON	OUI NON	OUI
TSP-1 / TSP-2	Forme soluble : - Forme liée à la matrice : +	± / NON	± / NON	OUI
uPA	+	OUI	OUI	OUI
VEGF-A165 VEGF-C	+ +	OUI NON	OUI NON	OUI OUI

Tableau 21 : Liste des molécules impliquées dans les cancers des VADS et détectées par le kit « proteome profilerTM array » : récapitulatif de leur présence dans les milieux conditionnés issus des Cal27 et des FaDu (± : en dessous du seuil de détection limite). Molécule ayant une activité pro-angiogénique (+) ou anti-angiogénique (-).

IV. Effet des milieux conditionnés sur les cellules endothéliales :

Le cetuximab, en diminuant la libération de molécules pro-angiogéniques comme le VEGF devrait avoir un rôle anti-angiogénique et ainsi diminuer l'activité métabolique, la viabilité et/ou la formation de tubes pseudo-capillaires par les cellules endothéliales *in vitro*.
L'effet angiogénique des ces signaux moléculaires a été étudié dans un modèle *in vitro* de culture de cellules endothéliales dans les milieux conditionnés analysés dans la partie 1. Le résultat de ces travaux a été publié dans la revue Microvascular Research (V. Jouan-Hureaux et al, 2011) (272) ; une copie de l'article figure en annexe.

Pour alléger le discours, l'utilisation des abréviations suivantes semble nécessaire :

CM-Cal27 : milieux conditionnés issus de la culture des cellules tumorales Cal27

CM-FaDu : milieux conditionnés issus de la culture des FaDu

De même, les milieux conditionnés issus de la culture des cellules tumorales exposées au cetuximab sont appelés : CM-Cal27-Cetux ou CM-FaDu-Cetux.

IV.1. Effet du cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC :

IV.1.a. Influence de la concentration en cetuximab :

L'effet des milieux conditionnés sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales sont présentés dans la figure 102.
L'activité métabolique des HUVEC est diminuée lorsqu'elles sont cultivées en présence de milieux conditionnés, et ce, quelle que soit la lignée tumorale utilisée. Cependant la viabilité des HUVEC n'est significativement diminuée qu'au contact des CM-FaDu. Le cetuximab utilisé lors de la fabrication de ces CM n'a pas d'effet sur la viabilité des HUVEC quelle que soit la concentration utilisée.

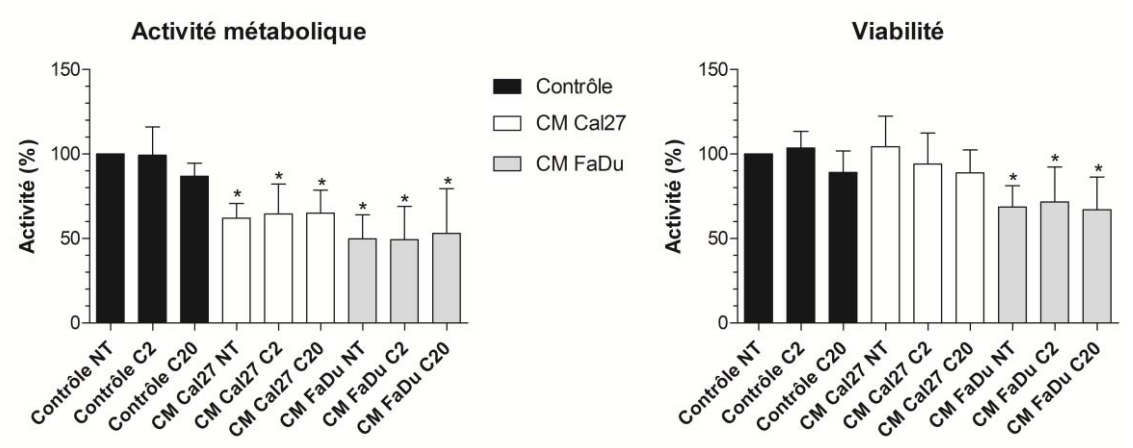


Figure 102 : Effet des CM sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales : mesure de l'activité métabolique (à gauche) et de la viabilité (à droite) des HUVEC cultivées pendant 48 heures dans les milieux contrôles (en noir) ou en présence de CM issus de la culture des Cal27 (en blanc) ou des FaDu (en gris) exposées à 2 ou 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures (C2 et C20 respectivement). (n=3, triplicat, $p<0,05$; * : versus milieu contrôle NT).

L'observation de cette baisse de l'activité métabolique des HUVEC induite par les milieux conditionnés nous a amené à supposer que ces milieux conditionnés, récupérés après 48 heures de culture des cellules tumorales, pouvaient être appauvris en éléments essentiels au maintien de l'activité métabolique des HUVEC.

IV.1.b. Influence de l'enrichissement des milieux conditionnés avec du milieu frais :

Les milieux conditionnés contiennent des facteurs libérés par les cellules tumorales mais la quantité de certains nutriments nécessaires à la croissance des cellules est diminuée (glucose, acides aminés…). Ainsi, la diminution de l'activité métabolique observée avec les milieux conditionnés pourrait est due à une carence en nutriments. Pour vérifier cela, nous avons tenté de compenser cet appauvrissement par un apport exogène de nutriment apporté par du milieu de culture frais et contenant entre autre du SVF. Nous avons donc évalué l'effet de ces milieux conditionnés dilués sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC (Cf. figure 103).

Les résultats montrent que l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC ne sont pas significativement modifiées par l'apport de nutriments supplémentaires.

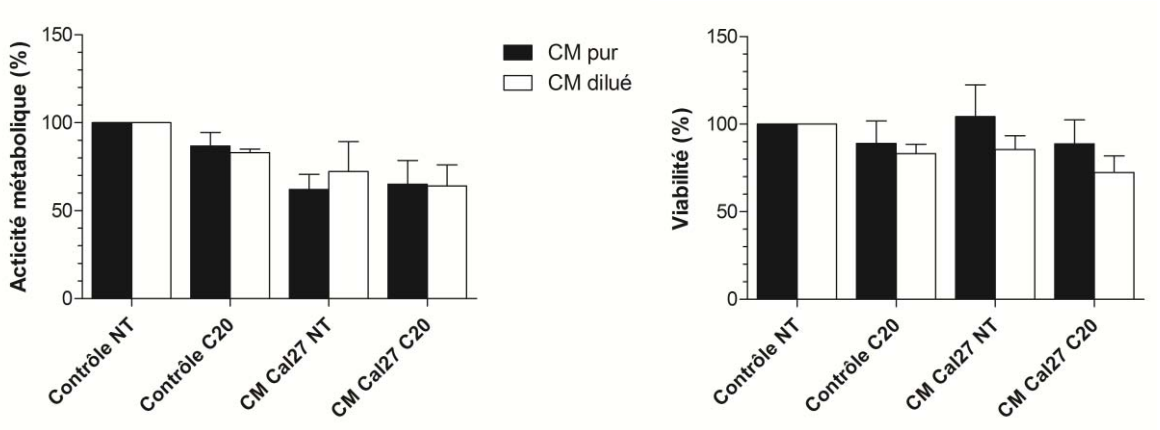


Figure 103 : Effet de la dilution des milieux conditionnés sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC : mesure de l'activité métabolique (à gauche) et de la viabilité (à droite) des HUVEC cultivées pendant 48 heures dans les milieux conditionnés pur (en noir) ou les milieux conditionnés dilués au ½ avec du milieu de culture contenant 10 % SVF. (n=3 pour CM pur, n=2 pour CM dilué).

La diminution de l'activité métabolique n'étant pas due à un manque nutritionnel, nous avons continué notre étude en utilisant des milieux conditionnés purs, c'est-à-dire sans apport exogène.

IV.2. Effet du cetuximab sur la formation des tubes pseudo-capillaires *in vitro* :

L'analyse des facteurs impliqués dans l'angiogenèse et présents dans les milieux conditionnés ne permettent pas de prédire l'effet de la balance angiogénique induite par ces milieux sur l'angiogenèse. C'est pourquoi, l'effet angiogénique des milieux conditionnés a été évalué dans un modèle de culture de cellules endothéliales sur une matrice, modèle permettant la formation d'un réseau de tubes pseudo-capillaires.

Comme on peut l'observer sur les photos prises par microscopie de fluorescence (Cf. figure 104), l'effet direct du cetuximab présent dans les milieux de culture contrôles se traduit par une légère diminution de la formation des tubes pseudo-capillaires (voir les astérisques sur la figure 104). A l'inverse, les résultats obtenus avec les milieux conditionnés issus des cellules tumorales traitées au cetuximab ne sont pas en faveur d'un effet anti-angiogénique, comme il est indiqué dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP). Au contraire, l'effet induit est un effet plutôt pro-angiogénique. En effet, la structure du réseau de tubes pseudo-capillaires formé par les HUVEC augmente significativement lorsqu'elles sont cultivées en présence de CM préparés avec du cetuximab (voir les flèches sur la figure 104), contrairement

aux CM préparés sans cetuximab. Cet effet se traduit par une augmentation de la densité et de la longueur totale du réseau mais également du nombre de jonction (Cf. figure 104). L'effet est plus marqué avec les CM-Cal27-Cetux comparativement aux CM-FaDu-Cetux.
Il est intéressant de rappeler que ces mêmes milieux conditionnés induisaient une baisse de l'activité métabolique des cellules endothéliales.

L'effet de ces milieux conditionnés a également été évalué dans un autre modèle un peu plus complexe d'angiogenèse : le modèle *ex vivo* de culture d'anneaux aortiques de souris et réalisé dans le cadre du doctorat de l'UHP-Nancy 1 de J. Mriouah soutenue publiquement le 8 novembre 2010. Les résultats obtenus montrent également une augmentation du réseau pseudo-capillaire lorsque les anneaux aortiques sont cultivés en présence des CM-Cal27-Cetuximab. L'effet paradoxalement pro-angiogénique de ces milieux semble donc confirmé.

IV.3. Effet du cetuximab sur l'expression de récepteurs endothéliaux impliqués dans l'angiogenèse :

Pour tenter d'expliquer cet effet pro-angiogénique observé, nous avons cherché à caractériser l'effet des ces milieux conditionnés sur le phénotype des cellules endothéliales. Nous avons choisi d'analyser l'expression totale de certains récepteurs membranaires des HUVEC impliqués dans l'angiogenèse comme PECAM-1, VEGFR-2 et Notch-4. Nous avons également choisi d'étudier l'expression d'EGFR par les cellules endothéliales car des études ont montré qu'*in vivo*, les cellules endothéliales pouvaient devenir tumorales par expression d'EGFR (130, 207, 273).

L'expression totale de ces protéines membranaires a été évaluée par la technique de western blot (Cf. figure 105). L'expression de la β-tubuline ne varie pas avec l'expérience et nous a servi de référence pour normaliser l'expression des résultats.
Les résultats montrent qu'il n'y a pas de variation significative dans l'expression de VEGFR-2 , PECAM-1 et Notch. Mais, il semble tout de même que l'expression de PECAM-1 diminue lorsque les HUVEC sont cultivées en présence des CM-Cal27 et semble augmenter en présence des CM-FaDu. De plus, l'expression de VEGFR-2 diminue sous l'effet direct du cetuximab sur les cellules HUVEC. Cet effet est également observé lorsqu'elles sont cultivées en présence de CM issus des deux lignées tumorales. Seulement, les écarts-types sont trop importants pour observer de réelles différences significatives.

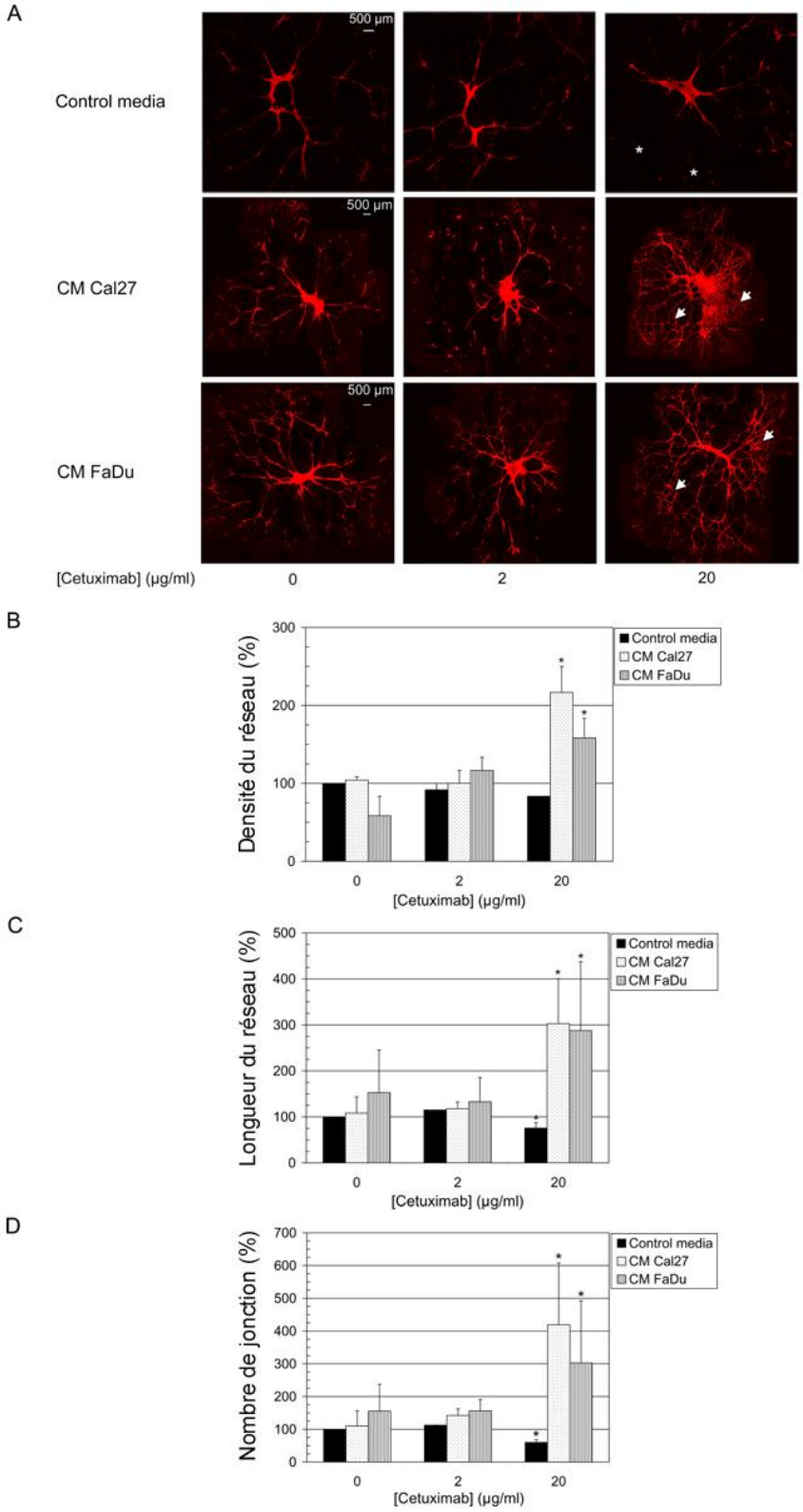


Figure 104 : Effet des milieux conditionnés préparés en présence de cetuximab sur la formation des tubes pseudo-capillaires *in vitro*. Les cellules HUVEC ont été cultivées sur une matrice en présence de milieux contrôles (en noir) ou de milieux conditionnés par les cellules Cal27 (en blanc) et FaDu (en gris) exposées à 2 ou 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. Représentation du réseau capillaire après marquage à la phalloidine-SR par microscopie de fluorescence (**A**). Analyse de la densité du réseau pseudo-capillaire (surface occupée par les cellules endothéliales /surface totale du champ observé) (**B**), de la longueur du réseau (**C**) et du nombre de jonction (**D**) calculés à l'aide du logiciel dédié AngioSys (n=3, $p<0,05$; * : versus control media sans cetuximab).

Néanmoins, nos résultats montrent que les HUVEC expriment faiblement EGFR lorsqu'elles sont cultivées dans les milieux contrôles. Cette expression ne semble pas varier sous l'effet des CM-Cal27 mais, curieusement, l'expression d'EGFR est exacerbée lorsque les HUVEC sont exposées aux CM-Cal27-Cetuximab (expression x2). A l'inverse, EGFR est significativement surexprimé par les cellules HUVEC cultivées en présence de CM-FaDu, et cette surexpression diminue sous l'effet du cetuximab présent dans les CM-FaDu-Cetuximab, jusqu'à atteindre le niveau basal à la concentration de 20 µg/mL.

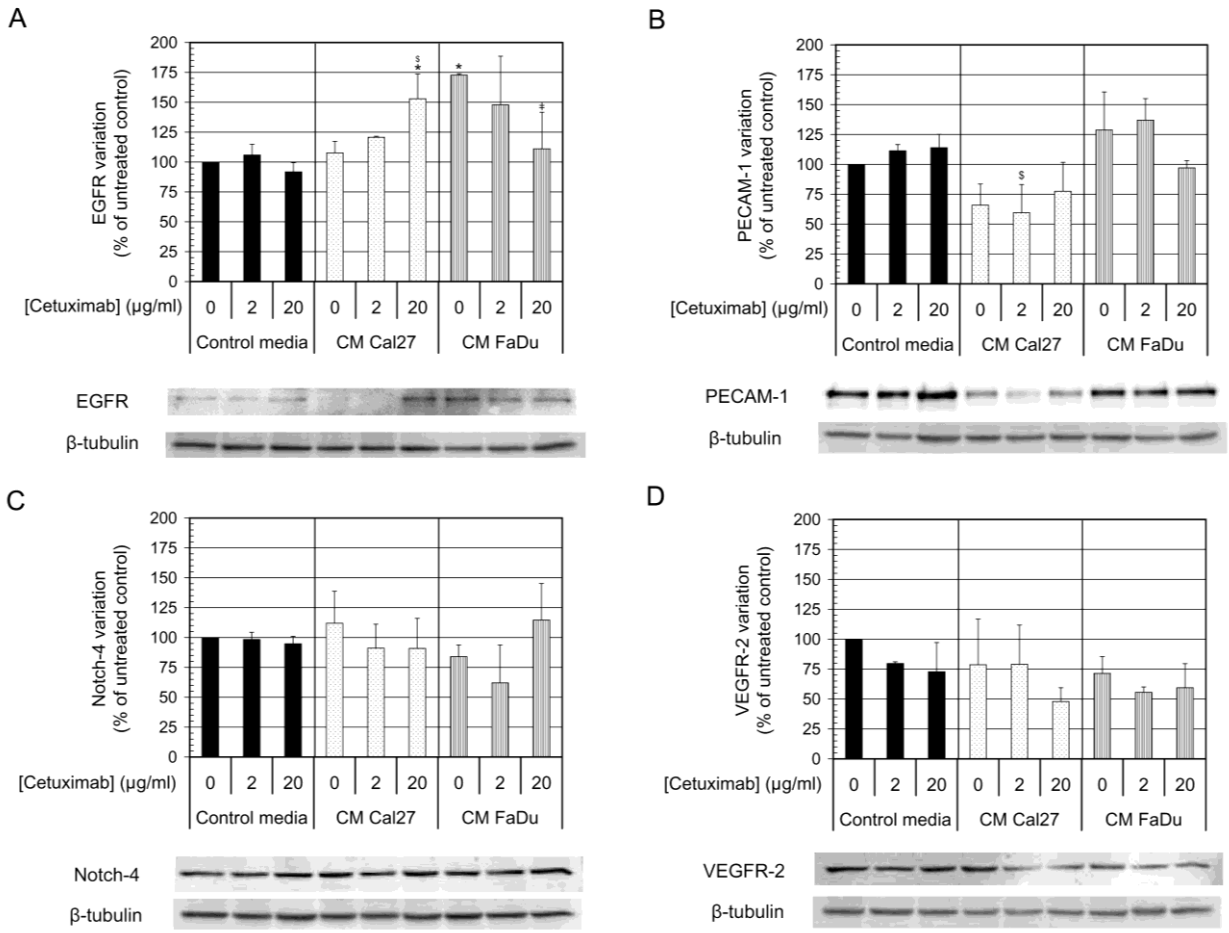


Figure 105 : Expression d'EGFR (A), PECAM-1 (B), Notch-4 (C) et VEGFR-2 (D) par les cellules endothéliales : les cellules HUVEC ont été cultivées pendant 48 heures en présence des milieux contrôles (en noir), des milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 (en blanc) ou FaDu (en gris barré) exposées ou non à 2 ou 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. L'expression de la β-tubuline a permis la normalisation des résultats. (n=3, $p<0,05$; * : versus milieu contrôle sans cetuximab).

Ainsi, l'activité modérément anti-angiogénique directe du cetuximab sur les cellules endothéliales pourrait être associée à une baisse de l'expression de VEGFR-2. Paradoxalement, lorsque le réseau pseudo-capillaire est augmenté suite à l'influence des

cellules tumorales, on constate une légère diminution de l'expression du récepteur VEGFR-2. Cette réduction de VEGFR-2 est en adéquation avec la diminution de sécrétion du VEGF par les cellules Cal27 ou FaDu en réponse au cetuximab. Ainsi le développement du réseau pseudo-capillaire ne semble pas être corrélé avec la signalisation VEGF/VEGFR-2.
La signalisation endothéliale dépendante d'EGFR semble particulière et a attiré notre attention pour la suite du travail. On constate une surexpression d'EGFR par les HUVEC soumises à l'influence des signaux moléculaires envoyés par les cellules tumorales. Mais, selon la lignée utilisée, cette surexpression est inversée.
Ces résultats nous renseignent sur l'expression globale des protéines par les cellules HUVEC mais pas sur l'expression membranaire d'EGFR à la surface de ces cellules endothéliales. En effet, les analyses réalisées par la technique de western blot sont effectuées à partir de lysats cellulaires. Ceux-ci contiennent non seulement les protéines membranaires mais également les protéines cytoplasmiques. Nous avons donc voulu vérifier la présence d'EGFR à la surface des cellules HUVEC par cytométrie en flux en utilisant un anticorps spécifique marqué au FITC. Malheureusement aucune expression membranaire d'EGFR n'a été retrouvée sur les cellules HUVEC exposées aux différents milieux conditionnés. Cela provient peut-être du fait que le nombre de récepteur EGFR à la surface des HUVEC est faible et ne permet pas d'être détecté par cette technique.

Malgré ces résultats, nous avons voulu poursuivre sur cette voie afin de comprendre comment les HUVEC pouvaient acquérir cette capacité à surexprimer EGFR. Cette étude est développée dans la partie 3 de ce travail expérimental.

V. Evaluation de l'effet du panitumumab :

Afin de vérifier si l'effet du cetuximab était dû à un effet de classe ou était propre à la molécule elle-même, nous avons évalué, dans les même conditions que pour le cetuximab, l'efficacité du panitumumab sur l'angiogenèse induite par nos deux lignées Cal27 et FaDu. Le panitumumab est un anticorps humanisé ciblant EGFR en cours d'évaluation en Espagne dans les carcinomes des VADS. L'étude est en cours mais nous présentons ici les premiers résultats obtenus. Ceux-ci semblent montrer une réponse différente des cellules tumorales exposées au panitumumab comparativement au cetuximab.

V.1. Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules tumorales :

Dans un premier temps, nous avons exposé les cellules tumorales à différentes concentrations de panitumumab et regardé l'effet du médicament sur l'activité métabolique et la viabilité de ces cellules après 48 heures d'incubation. Les résultats sont donnés dans la figure 106.

Le panitumumab induit une diminution modérée de l'activité métabolique des cellules Cal27 quelle que soit la concentration utilisée (≈-15 %) tandis que la viabilité de ces cellules est très fortement diminuée (-50 % relevé au maximum de l'inhibition). Cet effet sur la viabilité des Cal27 semble avoir lieu de manière dose dépendante jusqu'à 50 µg/mL de médicament. L'effet du panitumumab sur l'activité métabolique des cellules FaDu est plus marqué comparativement aux Cal27 avec une inhibition de 30 % quelle que soit la concentration utilisée. L'effet sur la viabilité des cellules FaDu semble similaire à celui des Cal27 avec une inhibition de la viabilité qui fluctue également entre 30 % et 50 % selon la concentration utilisée.

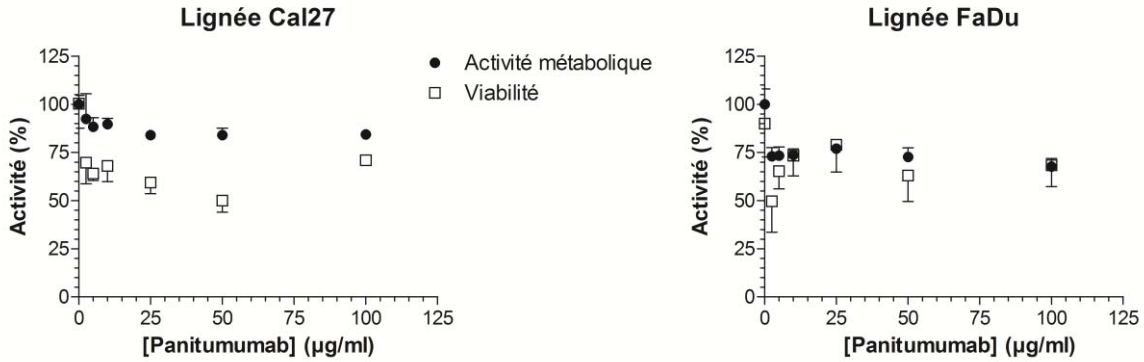


Figure 106 : Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules tumorales : mesure de l'activité métabolique (MTT, rond noir) et de la viabilité (Hoechst, carré blanc) des cellules Cal27 (à gauche) et des FaDu (à droite) après 48 heures d'exposition au panitumumab (0-100 µg/mL). (n=1, triplicat).

Ainsi, le panitumumab semble avoir une action plutôt cytotoxique sur les lignées tumorales. Cet effet cytotoxique est également observé sur les cellules FaDu, cellules dont la viabilité n'était pas diminuée sous l'influence du cetuximab. Cet anticorps humanisé ciblant EGFR semble donc avoir une efficacité différente du cetuximab.

Nous avons donc voulu savoir si cette molécule pouvait avoir un effet sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales.

V.2. Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales :

L'effet direct du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales ont été étudiés après 48 heures d'incubation et les résultats sont donnés dans la figure 107. Le panitumumab n'a pas d'effet sur la viabilité des cellules endothéliales quelle que soit la concentration testée. Ce médicament ne semble pas avoir d'effet sur l'activité métabolique des HUVEC, excepté peut-être à 100 µg/mL mais cela demande à être confirmé vu l'écart-type obtenu.

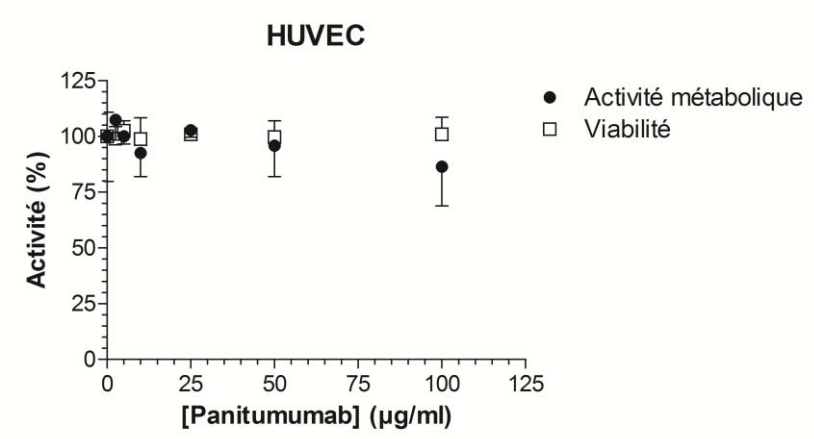


Figure 107 : Effet du panitumumab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales : mesure de l'activité métabolique (MTT, rond noir) et de la viabilité (Hoechst, carré blanc) des cellules HUVEC après 48 heures d'exposition au panitumumab (0-100 µg/mL). (n=1, triplicat).

Compte tenu des résultats ci-dessus, nous avons poursuivi notre étude en utilisant 2 et 20 µg/mL de panitumumab, concentrations identiques à celles utilisées lors de l'évaluation du cetuximab.

V.3. Effet du panitumumab sur la composition des milieux conditionnés :

Les milieux conditionnés ont été obtenus après exposition des cellules Cal27 et FaDu à 2 et 20 µg/mL de panitumumab pendant 48 heures.

V.3.a. Dosage des protéines totales :

Le résultat du dosage des protéines totales présentes dans les différents milieux conditionnés obtenus est donné dans la figure 108. Comme attendu, les milieux conditionnés contiennent une quantité plus importante de protéines par rapport aux milieux contrôles et ce, quelle que soit la lignée utilisée. L'exposition des cellules tumorales au panitumumab n'influence pas de manière significative la quantité de protéines totales sécrétées par ces cellules.

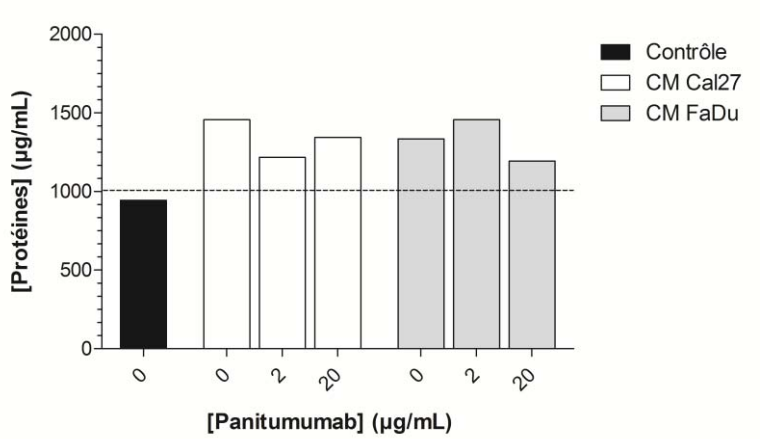


Figure 108 : Effet du panitumumab sur la quantité de protéines sécrétées par les cellules tumorales dans les milieux conditionnés : dosage des protéines totales contenues dans les milieux contrôles (en noir) et les milieux conditionnés issus des Cal27 (en blanc) ou des FaDu (en noir) après exposition à 2 ou 20 µg/mL de panitumumab pendant 48 heures. (n=1, duplicat).

V.3.b. Evaluation de la libération des facteurs impliqués dans l'angiogenèse :

Comme pour l'étude du cetuximab, nous avons effectué un screening et une étude semi-quantitative des protéines impliquées dans l'angiogenèse contenues dans les différents milieux conditionnés par la technique des arrays. Les résultats sont donnés dans la figure 109.
Les cellules Cal27 secrètent une plus grande variété de facteurs comparativement aux FaDu même en présence du médicament.
Le panitumumab induit une diminution de la sécrétion du facteur anti-angiogénique TIMP-1 par les Cal27 mais également une augmentation du facteur pro-angiogénique IL-8 (Cf. figure 109 A). D'autres facteurs, possédant une activité pro- ou anti-angiogénique selon le contexte, comme l'amphiréguline, IGFBP-1 ou TSP-1 sont exprimés de manière assez faible mais semblent augmenter sous l'effet du traitement. Bizarrement, la sécrétion du VEGF par les Cal27 ne semble pas être influencée par le panitumumab contrairement à celle des cellules FaDu.

Les cellules FaDu ne sécrètent pas une grande variété de facteurs (Cf. figure 109 B). La sécrétion des facteurs pro-angiogéniques comme l'IL-8, l'uPA et le VEGF sont diminués ainsi que l'expression des facteurs anti-angiogéniques tels que PAI-1 et TIMP-1.

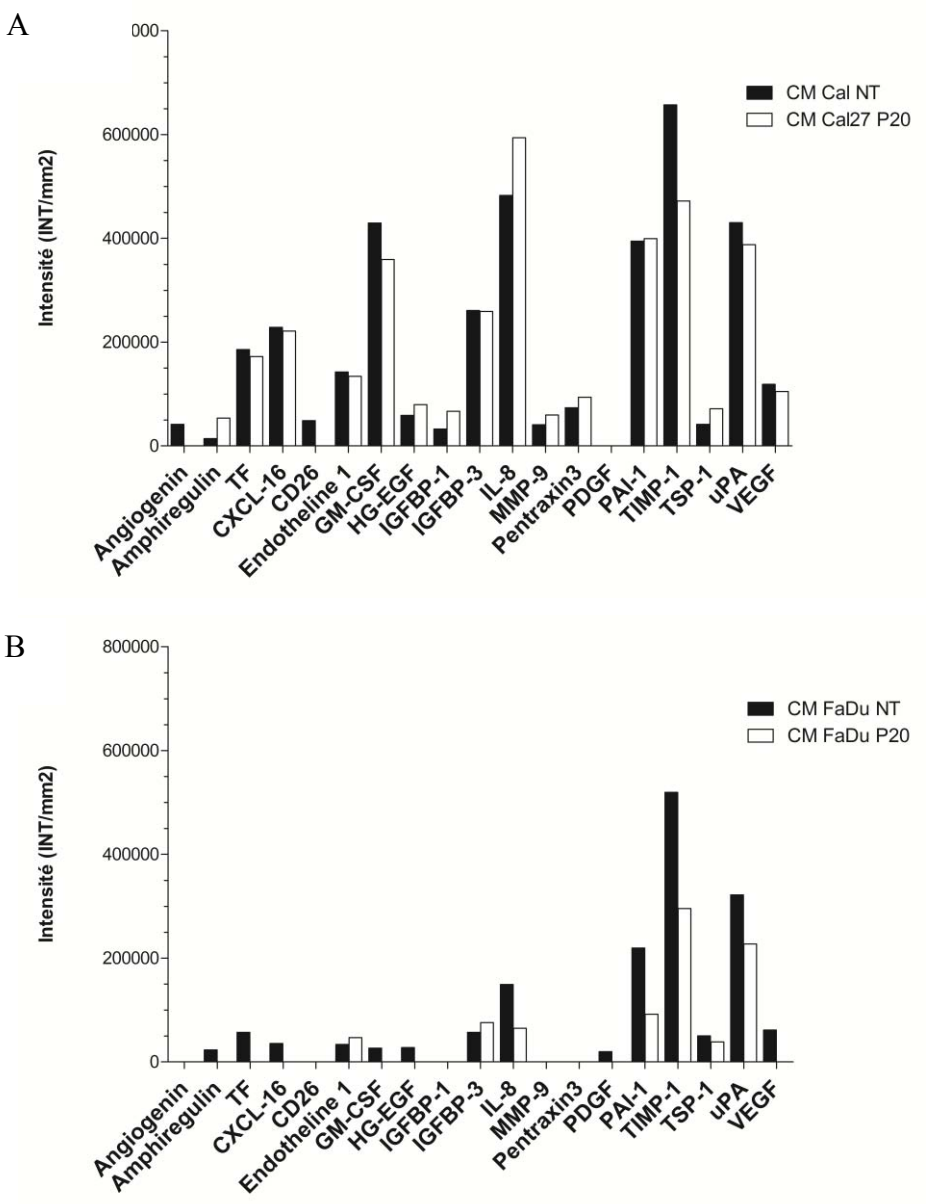


Figure 109 : Analyse de l'expression des protéines impliquées dans l'angiogenèse et libérées dans les milieux conditionnés : quantification des protéines détectées par le kit Proteome Profiler Array dans les CM issus de la culture des Cal27 (A) et des FaDu (B) exposées (en blanc, P20) ou non (en noir, NT) à 20 µg/mL de panitumumab.

La comparaison des effets du panitumumab et du cetuximab sur la sécrétion de quelques protéines retrouvées dans les milieux conditionnés est présentée dans le tableau 22 ci-dessous :

	CAL27		FaDu	
Agents	Cetuximab	Panitumumab	Cetuximab	Panitumumab
VEGF	↓	±	↓	↓0
IL-8	↓	↑	↓	↓
PAI-1	±	-	↓	↓
TIMP-1	±	↓	↓	↓
FT	↓	-	-	↓0
MMP-9	↓	↑	-	ND
uPA	↓	↓	↓	↓
Ang	↑	↓0 (faible)	-	ND
ET-1	↓	-	↑	↑
Amphireguline	ND	↑	ND	↓0 (faible)
TSP-1	ND	↑	ND	-

Tableau 22 : Comparaison des effets du panitumumab et du cetuximab sur la sécrétion des protéines impliquées dans l'angiogenèse : analyse des CM issus des lignées tumorales Cal27 et FaDu. (↑ : sécrétion augmentée, ↓ sécrétion diminuée, ↓0 : sécrétion inhibée à 100%, ± : effet modéré, - : pas d'effet, ND : non détecté).

Les cellules FaDu semblent réagir de la même façon lorsqu'elles sont exposées à ces deux agents ciblant EGFR. En effet les variations observées de la sécrétion de la plupart des protéines indiquées dans le tableau 22 vont dans le même sens. Ce n'est pas le cas avec les cellules Cal27. En effet, les cellules Cal27 diminuent la sécrétion d'IL-8 lorsqu'elles sont exposées au cetuximab mais l'augmentent sous l'effet du panitumumab. Il en est de même pour d'autres protéines comme la MMP-9 ou le VEGF. Seule la sécrétion de l'uPA est modulée de la même manière par ces deux anticorps.

Lorsque l'on s'intéresse aux effets de l'anticorps humanisé anti-EGFR observés sur la sécrétion de ces protéines par les lignées Cal27 et FaDu, on s'aperçoit que les variations vont dans le même sens, excepté pour l'IL-8.

Encore une fois, il est difficile de prédire l'effet résultant de ces milieux sur l'angiogenèse. Ainsi, seule l'analyse de l'effet angiogénique induit par les milieux conditionnés dans notre modèle d'angiogenèse *in vitro* nous permettra de savoir si le panitumumab agit ou non de la même façon que le cetuximab. Cette étude nous permettra d'en déduire si l'effet pro-angiogénique observé avec les CM-cetuximab est dû ou non à un effet de classe thérapeutique.

VI. Discussion :

L'objectif de cette étude était de mieux comprendre l'influence des thérapies ciblées sur la communication entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales. Cette étude est la première, à notre connaissance, à évaluer le comportement des cellules endothéliales cultivées avec les milieux conditionnés issus de la culture des cellules tumorales de cancers épidermoïdes des VADS exposées à des anticorps monoclonaux ciblant EGFR (le cetuximab et le panitumumab).

Le cetuximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre EGFR et est utilisé en clinique pour le traitement des tumeurs VADS en association à la radiothérapie ou à la chimiothérapie. Le panitumumab est un anticorps humanisé anti-EGFR actuellement en étude de phase II en Espagne pour le traitement en première ligne en association avec la chimiothérapie pour le traitement des cancers des VADS récurrents et métastatiques (site internet Orphanet, http://www.orpha.net/). Mais il est généralement utilisé en clinique dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques en monothérapie après échec des chimiothérapies. Le cetuximab et le panitumumab se lient sur le même domaine extracellulaire du récepteur EGFR (domaine III) et le bloque dans sa forme inactive (274) ; ils inhibent ainsi l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur dont la survie et la prolifération cellulaire.

Depuis de nombreuses années, un effet anti-angiogénique indirect (127) est attribué aux anti-EGFR et notamment au cetuximab par diminution de la libération du VEGF, de l'IL-8 et du FGF-2 par les cellules tumorales (124, 261-262) mais sans étudier réellement l'effet de cette molécule sur l'angiogenèse. Plus récemment, une augmentation de la densité vasculaire a été observée *in vivo* par différentes équipes avec des traitements inhibant l'activité tyrosine kinase d'EGFR (erlotinib, gefitinib). Cet effet peut expliquer l'efficacité de leur association avec la radiothérapie. Ainsi l'augmentation de la densité vasculaire est constatée *in vivo* malgré une inhibition de la sécrétion de VEGF, d'IL-8, de FGF-2. C'est pourquoi, il nous a paru intéressant de préciser le rôle des anti-EGFR dans l'angiogenèse pour expliquer, notamment, d'éventuels phénomènes de résistance et d'envisager leur association avec d'autres agents thérapeutiques.

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous sommes attachés à vérifier l'efficacité du cetuximab et du panitumumab sur nos deux lignées de cancers des VADS : les cellules Cal27 et FaDu. Nos résultats montrent que le cetuximab induit une diminution de l'activité de l'enzyme déhydrogénase mitochondriale des Cal27 et des FaDu mais ne diminue que la

viabilité des Cal27 mesurée par un test d'incorporation de l'ADN. L'effet du panitumumab sur ces lignées est plus marqué avec une diminution de l'activité métabolique des Cal27 et FaDu mais également de la viabilité de ces deux lignées.
Cette différence vient probablement du fait que le panitumumab a une affinité nettement supérieure pour EGFR (Kd 0,05 nM, (275) comparativement au cetuximab (Kd 0,2 nM, Clin cancer Res 1995 Goldman). L'affinité de ce dernier pour le récepteur est du même ordre de grandeur que celle du ligand naturel EGF (Kd 0,26 nM, (276). De plus, le panitumumab est également capable de bloquer la liaison du TGF-α et provoque ainsi un effet supérieur au cetuximab. Malgré cette différence d'affinité, ces deux molécules induisent les mêmes effets sur les cellules tumorales : inhibition de la prolifération cellulaire, arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, régulation négative de l'expression d'EGFR à la surface par internalisation du récepteur.

Les lignées tumorales Cal27 et FaDu surexpriment le récepteur EGFR via une augmentation de la transcription du gène mais également par une sur-repésentation du gène retrouvé chez ces lignées (277). Seulement ces deux lignées surexpriment EGFR à des niveaux différents. En effet, en accord avec la littérature (278), nous avons trouvé, par la technique de western blot, que les cellules Cal27 expriment significativement plus d'EGFR que les FaDu.
Cependant, des mutations dans les voies de signalisation en aval d'EGFR ont été reportées et sont impliquées dans les mécanismes de résistances aux traitements (279, 280). BRAF et KRAS ne sont pas mutés dans nos lignées (281). Le récepteur mutant EGFRvIII (tronqué au niveau du domaine de liaison du ligand et activé constitutivement) a été détecté par western blot chez les Cal27 et semble représenter 30 % de l'expression d'EGFR total. Les FaDu expriment plus faiblement EGFR (30 % comparativement aux Cal27) et la bande correspondant à EGFRvIII n'a pas été détectée, peut-être en raison de la faible proportion de ce récepteur qui se confond avec le bruit de fond. Il a été reporté une mutation de NRAS chez les Cal27 (277) et des mutations de PI3K dans les deux lignées utilisées (282). Tout cela peut expliquer la faible inhibition de la viabilité et de l'activité métabolique des cellules observées après exposition à cet agent.
Le cetuximab n'a pas le même effet sur la viabilité des Cal27 et des FaDu et peut être expliqué par une différence dans le niveau d'expression de la cycline D1. En effet, Larry H. Kalish et al. ont montré que les FaDu surexpriment plus cette protéine et possèdent une plus grande amplification du gène de la cycline D1 (283) comparativement aux Cal27 ; et celle-ci serait responsable de la résistance de ces cellules vis-à-vis du gefinitib (EGFR-TKI). De plus,

Liu et al. ont montré que les cellules possédant un fort taux de cycline D1, comme les FaDu, étaient plus invasives (284) ; la cycline D1 joue donc un rôle indépendamment de la régulation du cycle cellulaire.

Dans une deuxième partie, nous avons évalué l'effet de ces médicaments sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales afin de connaître l'effet direct des anti-EGFR sur ces cellules. Le cetuximab diminue l'activité métabolique des HUVEC à partir de 25 µg/mL de cetuximab mais n'a pas d'influence sur la viabilité de ces cellules ; le panitumumab ne semble pas avoir d'effet significatif. Ainsi les concentrations de 2 et 20 µg/mL utilisées dans notre étude sont suffisantes pour diminuer la viabilité des cellules cancéreuses mais sans présenter d'effet majeur sur les cellules endothéliales. Par ailleurs, ces concentrations sont inférieures aux concentrations sériques de médicament retrouvées après 3 semaines de traitement en monothérapie de patients atteints de tumeurs des VADS : concentration moyenne 40 µg/mL avec un maximum de 155 µg/mL (page du Vidal). Cette faible activité des anti-EGFR sur les cellules endothéliales est cohérente avec les analyses de l'expression membranaire d'EGFR à la surface des HUVEC par la technique de cytométrie en flux. En effet, nous n'avons pas détecté la présence de ce récepteur à la surface des cellules endothéliales.

Différentes conditions de culture des cellules tumorales ont été testées dans ce travail afin d'évaluer la réponse de ces cellules vis-à-vis des traitements et de pouvoir choisir les conditions les plus adaptées pour l'étude des milieux conditionnés.
Tout d'abord, l'effet inhibiteur du cetuximab en présence d'EGF a été évalué. Ce facteur est capable de stimuler la croissance des Cal27 mais pas celle des FaDu. Le cetuximab est capable d'inhiber l'activité métabolique des Cal27 et des FaDu et la viabilité des cellules Cal27 même en présence du ligand, avec un effet moins marqué avec 10 ng/mL d'EGF. De plus, les milieux conditionnés fabriqués dans ces conditions n'influencent pas la viabilité et l'activité métabolique des HUVEC. Cependant, il a été montré qu'EGF était capable d'induire la formation de tubes pseudo-capillaires par les cellules endothéliales *in vitro* (285, 286). De même, EGF est capable d'induire une augmentation de la synthèse de l'ADN et la migration des CE (265). Ainsi, pour ne pas interférer avec les molécules sécrétées par les cellules cancéreuses, nous avons donc choisi de continuer les expérimentations sans ajouter ce facteur de croissance.

Dans une troisième partie, nous avons évalué l'effet des différents milieux conditionnés par les cellules Cal27 et FaDu exposées ou non au cetuximab sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales. Ces milieux, quelle que soit la lignée tumorale utilisée, induisent une diminution de l'activité métabolique des cellules HUVEC ; effet ne pouvant pas être attribué à une diminution en nutriments nécessaires à la croissance lors du conditionnement des milieux comme nous l'avons démontré. Les milieux conditionnés contiennent donc un ou plusieurs facteurs libérés par les cellules tumorales et impliqués dans la baisse de ces activités.

Dans une quatrième partie, l'effet de ces milieux conditionnés sur l'angiogenèse a été évalué dans un modèle *in vitro* de culture de cellules endothéliales sur matrice.
Nos résultats montrent que le cetuximab induit directement une légère diminution de la taille du réseau formé par les cellules endothéliales. Ceci est en accord avec les observations de Hirata et al. qui ont montré un effet anti-angiogénique du gefitinib (inhibiteur de l'activité tyrosine kinase EGFR) par inhibition de l'activation d'EGFR dans les cellules endothéliales (263, 266). Seulement, dans nos travaux, l'expression d'EGFR par les HUVEC n'est pas diminuée significativement par l'action directe du cetuximab, les récepteurs EGFR n'ayant pas été détectés par cytométrie en flux. Cependant, on constate une surexpression d'EGFR total par les HUVEC cultivées en présence de milieux conditionnés par les cellules tumorales traitées au cetuximab.
Ainsi, lorsque l'on regarde l'effet indirect du cetuximab après exposition des HUVEC aux milieux conditionnés, les résultats obtenus ne montrent pas l'effet anti-angiogénique attendu du cetuximab. En effet le cetuximab est déclaré dans le résumé des caractéristiques du produit (RCP) comme étant anti-angiogénique du fait de sa capacité à diminuer la synthèse tumorale de VEGF *in vitro*. Or, nous avons trouvé le contraire. En effet, dans ces conditions, les cellules des VADS libèrent un ou plusieurs facteurs responsables de l'augmentation de la taille du réseau traduisant ainsi un effet pro-angiogénique induit par cet agent.

L'angiogenèse est régulée par une balance très fine entre les différents facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques. L'analyse des arrays ne nous a pas permis de trouver le ou les facteurs responsables de cet effet. Néanmoins, ces résultats semblent être en accord avec des publications rapportant une normalisation de la vascularisation *in vivo* observée après traitement des tumeurs avec le gefitinib (287) et l'erlotinib (288) (EGFR-TKI) avec une augmentation de la densité vasculaire et du flux sanguin. Dans cette étude, le traitement des

tumeurs n'a eu aucune conséquence sur la croissance de la tumeur probablement parce que l'augmentation des besoins sanguins était contrebalancée par l'effet anti-prolifératif de l'inhibiteur.

Cet effet pro-angiogénique a été observé quelle que soit la lignée utilisée alors que le niveau de sécrétion de VEGF par les FaDu est plus faible comparativement aux Cal27. De plus, l'augmentation du réseau a lieu en même temps qu'une diminution de la sécrétion de VEGF induit par l'exposition des cellules tumorales aux agents anti-EGFR comme cela a déjà été observé chez les cellules des VADS UM-SCC-9 et 11B (260).
Le facteur VEGF, facteur pro-angiogénique puissant, ne semble donc pas être impliqué dans l'effet pro-angiogénique observé. Seulement, le VEGF-A possède de nombreuses isoformes (121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 et 206 AA). Les formes les plus connues possèdent une activité pro-angiogénique. Mais une nouvelle famille de VEGF appelée VEGFxxxb a été identifiée par Bates et al. et présente une activité anti-angiogénique (289). C'est le rapport entre ces deux familles de VEGF qui détermine le potentiel angiogénique de ce facteur de croissance. Ainsi, la quantification de ces deux familles de VEGF nous aurait permis de savoir si la proportion de VEGFxxxb est diminuée sous l'effet du cetuximab et si le ratio VEGF/VEGFxxb peut expliquer l'activité pro-angiogénique observée.

La quantité d'autres molécules pro-angiogéniques est également diminuée sous l'effet du cetuximab comme pour l'IL-8 ; leur diminution avait déjà été reportée par d'autres auteurs (124, 261-262). Seulement, le FGF-2 n'a pas été retrouvé dans nos milieux. Le panitumumab diminue bien la libération de VEGF et d'IL-8 chez les FaDu comme évoqué dans la littérature (290) mais bizarrement la libération de l'IL-8 semble augmenter chez les Cal27.
Certains ligands d'EGFR ont été retrouvés en très faible quantité dans nos échantillons comme l'amphiréguline, l'HB-EGF ou NRG1- β1. Malheureusement le TGF-α (autre ligand d'EGFR) n'est pas détecté dans le kit utilisé, sa quantification aurait peut-être permis d'expliquer la différence de viabilité observée dans les deux lignées lors de l'exposition au cetuximab. Toutefois, l'équipe de Hickinson a reporté une plus grande quantité de la protéine TGF-α chez les FaDu comparativement aux Cal27 (277). De plus, dans un modèle de cancer du colon, Kuwai a montré que les cellules tumorales qui n'expriment pas EGFR ou HER-2 libèrent du TGF-α conduisant à l'activation d'EGFR dans les CE tumorales (273). Ainsi, les cellules tumorales Cal27 et FaDu exposées au cetuximab augmentent peut-être leur sécrétion

de TGF-α à l'origine de l'augmentation du réseau vasculaire observé dans notre modèle d'angiogenèse *in vitro*.

Ces différents ligands d'EGFR sont capables de se lier aux autres récepteurs de cette famille comme HER-2 et HER-3 exprimés par nos lignées. En effet, il a été montré que la protéine HER-2 était exprimée par les Cal27 contrairement à HER-3 qui a été retrouvé dans les deux lignées (277). Ainsi, ces récepteurs peuvent se dimériser éventuellement avec EGFR et induire la cascade de signalisation en aval. Il a été reporté que le cetuximab était capable de bloquer la dimérisation EGFR-EGFR et EGFR-HER-2 mais pas celle HER-2-HER-2 (291). De plus, Harari et al. ont montré que l'activation d'EGFR est impliquée dans l'augmentation de HER-2 et de HER-3 et de la voie de signalisation subséquente du récepteur et contribue ainsi à la résistance vis-à-vis des anticorps anti-EGFR (292). L'activité des autres récepteurs EGFR peut ainsi expliquer l'inhibition modérée de l'activité métabolique et de la viabilité des cellules tumorales induites par le cetuximab. En effet, les cellules HUVEC expriment HER-2, ErbB3 et ErbB4 ; et il a été montré que la bétacelluline (autre ligand d'EGFR) était capable d'induire l'angiogenèse par activation des voies de signalisation PI3K et MAPK et la phosphorylation de ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (265).

Le TGF-β n'est pas retrouvé dans nos milieux conditionnés quelle que soit la lignée utilisée alors que sa surproduction est retrouvée dans des cas de cancer des VADS avancés et est impliquée dans les processus de progression et d'invasion tumorale (293). Ceci est surprenant car TGF-β est capable d'induire la production de PAI-1 retrouvé dans nos milieux conditionnés (294). Des données suggèrent que cet inhibiteur des sérines protéases PAI-1 stabilise la structure les vaisseaux capillaires en formation et facilite l'invasion des cellules tumorales par un contrôle précis du microenvironnement protéolytique péritumoral (294).

L'angiogénine est un facteur pro-angiogénique également surexprimé dans les tumeurs des VADS (295) et est un facteur permissif pour l'angiogenèse induite par des facteurs autre que le VEGF par son rôle de ribonucléase (296). Seulement, ce facteur est très faiblement détecté dans les milieux conditionnés issus des FaDu. Mais sa libération semble légèrement augmenter sous l'effet du traitement et pourrait peut-être expliquer l'effet pro-angiogénique observé. Des études ultérieures sont nécessaires pour le confirmer.

L'IGF-1R est responsable de la résistance des Cal27 vis-à-vis du gefitinib (297), or le ligand IGFBP-1 est retrouvé en faible quantité dans nos milieux conditionnés, malgré une augmentation observée sous l'effet des traitements.

Malgré l'analyse de l'expression de 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse dans nos milieux conditionnés par la technique des arrays, nous n'avons pas pu trouver le ou les facteurs solubles capables de médier l'effet pro-angiogénique observé. Nous avons donc poursuivi l'étude en évaluant l'effet des milieux conditionnés sur l'expression de différents récepteurs endothéliaux impliqués dans l'angiogenèse par la technique de western blot. L'expression de VEGFR-2, de Notch-4 et de PECAM-1 ne semblent pas varier sous l'effet des milieux conditionnés. Cependant, bien qu'elles n'exposent pas EGFR à leur surface, les HUVEC sont capables d'exprimer EGFR comme cela a déjà été reporté par d'autres auteurs (129, 263). L'expression d'EGFR par les cellules endothéliales est augmentée lorsqu'elles sont cultivées dans les milieux conditionnés issus des Cal27 exposées au cetuximab. Bizarrement, les milieux conditionnés issus des FaDu sont capables d'induire une augmentation de cette expression, surexpression diminuant sous l'effet du traitement. Ceci suggère un mécanisme différent entre les deux lignées cellulaires. Al-Nedawi et al. ont montré que les cellules endothéliales étaient capables de devenir tumorales par acquisition d'EGFR (130) ; ce phénotype tumoral étant acquis par le transfert horizontal d'EGFR porté par des microvésicules (207, 217).

Nous avons donc poursuivi notre étude en évaluant l'effet des traitements anti-EGFR sur cette une nouvelle voie de communication cellulaire formée par les microvésicules. Les microvésicules sont des petits fragments membranaires relargués constitutivement par les cellules tumorales. Elles transportent de nombreux facteurs qui peuvent agir à proximité ou à distance du lieu de leur libération (298). Ce transfert d'information est responsable de nombreuses caractéristiques acquises par les cellules pendant leur transformation, dont l'angiogenèse (213). De plus, plusieurs équipes ont montré la présence de ces microvésicules dans le sérum de patients atteints de cancer des VADS (215, 221). Nous nous sommes donc demandé si ces microvésicules ne pourraient pas être responsables des effets observés.

Chapitre 3 : Evaluation des microvésicules libérées par les cellules tumorales exposées au cetuximab

Le but de cette partie était d'étudier la libération des microvésicules par les cellules tumorales, nommées TMV, et de caractériser l'expression de différents marqueurs à leur surface. Ces marqueurs pourront nous permettre de déterminer l'origine cellulaire de ces microvésicules mais également leur fonctionnalité.

Il est maintenant bien établi que les cellules tumorales relarguent des microvésicules impliquées dans le développement des cancers (Cf. partie bibliographie partie 4 paragraphe II). Ces microvésicules sont capables d'agir à proximité ou à distance du lieu de leur libération et sont impliquées dans l'angiogenèse. En effet, Taraboletti et al. ont montré qu'elles étaient capables d'induire la formation de structures capillaires *in vitro* (194). Cependant, leur rôle est différent en fonction du nombre de microvésicules libérées : un faible nombre serait plutôt stimulateur alors qu'un fort taux serait plutôt inhibiteur. Al-Nedawi et al. ont montré que les cellules endothéliales pouvaient acquiérir un phénotype tumoral après fusion avec des microvésicules tumorales portant EGFRvIII (217). Ces CE ainsi activées augmenteraient alors leur expression de VEGF.

Lors de l'analyse des milieux conditionnés, nous avions remarqué la présence d'un facteur habituellement ancré dans la membrane des cellules, le facteur tissulaire (TF). Les cellules tumorales sont connues pour exprimer ce facteur à leur surface. De plus, TF n'est pas soluble mais est généralement transporté sur une membrane. Ainsi, la présence de ce TF dans les milieux conditionnés nous a intrigués et c'est pourquoi nous avons voulu analyser la présence des microvésicules dans nos milieux conditionnés.

De plus, il a été montré que les cellules endothéliales pouvaient acquiérir un phénotype tumoral et exprimer EGFRvIII après capture de microvésicules tumorales (217). Ces microvésicules sont impliquées dans divers processus dont l'angiogenèse (Cf. bibliographie partie 4 paragraphe II.6).

Ainsi, l'étude des microvésicules nous permettrait :

- d'expliquer la sur-expression d'EGFR par les cellules endothéliales observée après culture des HUVEC en présence des CM,
- et d'expliquer l'augmentation du réseau vasculaire induit par ces mêmes milieux, malgré la baisse de sécrétion de VEGF par les cellules tumorales exposées aux anticorps ciblant EGFR.

Plusieurs catégories de microvésicules sont distinguées en fonction de leur taille. Les plus petites appelées exosomes (30-100 nm) nécessitent l'utilisation d'appareillage lourd et coûteux pour les isoler (gradient de densité, ultra-centrifugation). Les microvésicules proprement dites sont un peu plus grosses (entre 0,1 et 1 µm) et sont fortement étudiées par les hématologistes en raison de leur libération par tous les éléments figurés du sang et principalement par les plaquettes lors de leur activation.
La technique de détection des microvésicules par cytométrie en flux dans le sang de patient est maintenant bien établie depuis l'obtention d'un consensus international à l'automne 2010 dans le cadre du comité international de standardisation scientifique ISTH (244). Elle nécessite cependant un cytomètre de technologie récente permettant la détection de ces événements de taille microscopique. La plateforme Nancytomique créé en 2009 au CHU Nancy-Brabois est équipée d'un tel cytomètre (Navios), et nous avons pu y avoir accès. Pour débuter ce travail, nous avons donc choisi de n'étudier que les microvésicules proprement dites.

Dans un premier temps, nous avons préparé les milieux conditionnés comme pour les précédentes études. Cependant, toutes les cellules eucaryotes sont susceptibles de produire des microvésicules et elles sont trouvées en grand nombre dans le sérum, et notamment dans le sérum de veau fœtal utilisé pour cultiver nos cellules. Ainsi, nous avons dû dépléter les milieux de culture en microvésicules avant de les mettre en contact avec les cellules tumorales pour l'obtention des CM. Ainsi, les microvésicules détectées lors des analyses proviendront uniquement de nos lignées tumorales.

Puis, nous avons dû mettre au point une méthode de purification non délétère pour ces microvésicules. En effet, en tout premier lieu, nous avions voulu vérifier la présence de ces microvésicules en les observant par microscopie électronique mais nous nous sommes heurtés à un problème technique : ces particules ne supportent pas bien les centrifugations répétées nécessaires pour l'inclusion en résine. La technique de choix aurait été d'utiliser le SEM (scanning electron microscopy) où l'échantillon est directement adsorbé sur la grille de carbone avant d'effectuer les différents bains nécessaires à l'observation des structures. Mais nous n'avons pas pu bénéficier d'un tel équipement. Aussi, nous avons contourné le problème en effectuant une analyse de la taille des microvésicules présentes dans les milieux conditionnés par granulométrie laser. Cette technique permet l'analyse de la taille de microvésicules en suspension.

Dans un deuxième temps, nous avons adapté le protocole d'isolement des microvésicules issu du consensus international à la culture de nos cellules tumorales pour l'analyse de nos milieux conditionnés. Celui-ci nous a permis de :

- mettre en évidence la libération des microvésicules par nos deux lignées cellulaires Cal27 et FaDu,
- caractériser l'expression de plusieurs protéines membranaires à la surface des TMV comme EGFR, EPCAM et TF,
- d'étudier l'effet du cetuximab sur la quantité de TMV libérées par les cellules tumorales et sur le niveau d'expression des protéines membranaires.

Dans un troisième temps, nous avons voulu évaluer le risque thrombotique associé à la présence de ces microvésicules. En effet, les phospholipides présents à la surface des microvésicules peuvent servir de support à la coagulation plasmatique et la présence du TF sur ces microvésicules peuvent induire cette coagulation. Pour cela, nous avons étudié si nos TMV étaient capables d'induire la génération de thrombine par la technique de thrombinographie, technique disponible au service d'hématologie biologique du CHU Nancy-Brabois. L'effet du cetuximab sur cette génération de thrombine a également été évalué à travers la libération des microvésicules.

Enfin pour terminer, et puisque d'après Al-Nedawi et al. les cellules endothéliales sont capables de fusionner avec des microvésicules, nous avons voulu vérifier cette capacité avec nos TMV (217). Nous avons utilisé la méthode de cytométrie en flux et nous avons pu obtenir

des images de ces interactions grâce à l'utilisation de la technique d'imagerie en flux. Cette technique permet de coupler la cytométrie en flux avec l'imagerie microscopique (Amnis). Cet appareil est disponible à la plateforme technique Nancytomique du CHU Nancy-Brabois et nous avons pu l'utiliser.

Comme nous n'avons pas pu détecter la présence d'EGFR à la surface des cellules endothéliales nous n'avons pas utilisé ce marqueur pour suivre une éventuelle fusion avec les microvésicules. Ainsi, nous avons préféré marquer au préalable les TMV avec un fluorophore (le DiO) avant de procéder aux tests de fusion. Cependant, les centrifugations sont néfastes pour les TMV et nous n'avons pas pu les marquer directement au DiO. Nous avons donc résolu le problème en effectuant un marquage indirect, c'est-à-dire en marquant les cellules tumorales avant leur mise en culture pour l'obtention des milieux conditionnés et donc des TMV. De plus, en procédant de cette manière, la méthode de purification des TMV n'est pas modifiée ; la qualité et la reproductibilité des préparations s'en trouvent préservées.

Le DiO est une molécule s'insérant dans la bicouche lipidique et permet de marquer de façon homogène et continue la membrane des cellules tumorales. Nous avions essayé en tout premier lieu un marquage avec le PKH67, autre marqueur des phospholipides, mais le marquage apparaissait sous forme de points et n'était donc pas utilisable pour nos expérimentations.

I. Mise en évidence des TMV

Nous avons cherché à mettre en évidence, par microscopie électronique, la présence des microvésicules tumorales dans les milieux conditionnés. Les centrifugations répétées des échantillons nécessaires à l'imprégnation de la résine d'inclusion provoquent non seulement une perte d'échantillon mais également la formation d'artefacts. Nous avons donc opté pour une technique permettant de détecter et de mesurer la taille des microvésicules sans préparation particulière avant l'analyse de l'échantillon.

Les résultats de l'analyse des milieux conditionnés par granulométrie laser sont donnés dans la figure 110. Le graphique représentant les intensités en fonction de la taille des particules détectées montre deux pics pour les milieux contrôles (10 nm et 100 nm). Ces pics sont dus à la présence d'exosomes dans le sérum. En effet, nous avons pu dépléter le sérum de veau fœtal en microvésicules mais la vitesse de centrifugation utilisée ne permettait pas

l'élimination des exosomes. L'analyse des milieux conditionnés montre la présence d'un pic supplémentaire dont la taille moyenne se situe aux alentours de 3500 nm (Cf. figure 111). Ce pic correspond aux microvésicules proprement dites malgré une valeur de taille mesurée plus élevée par rapport à la taille pressentie (entre 0,1 et 1 µm). L'indice de polydispersité (PdI) est assez élevé et reflète la présence de plusieurs types de particules dans nos suspensions.

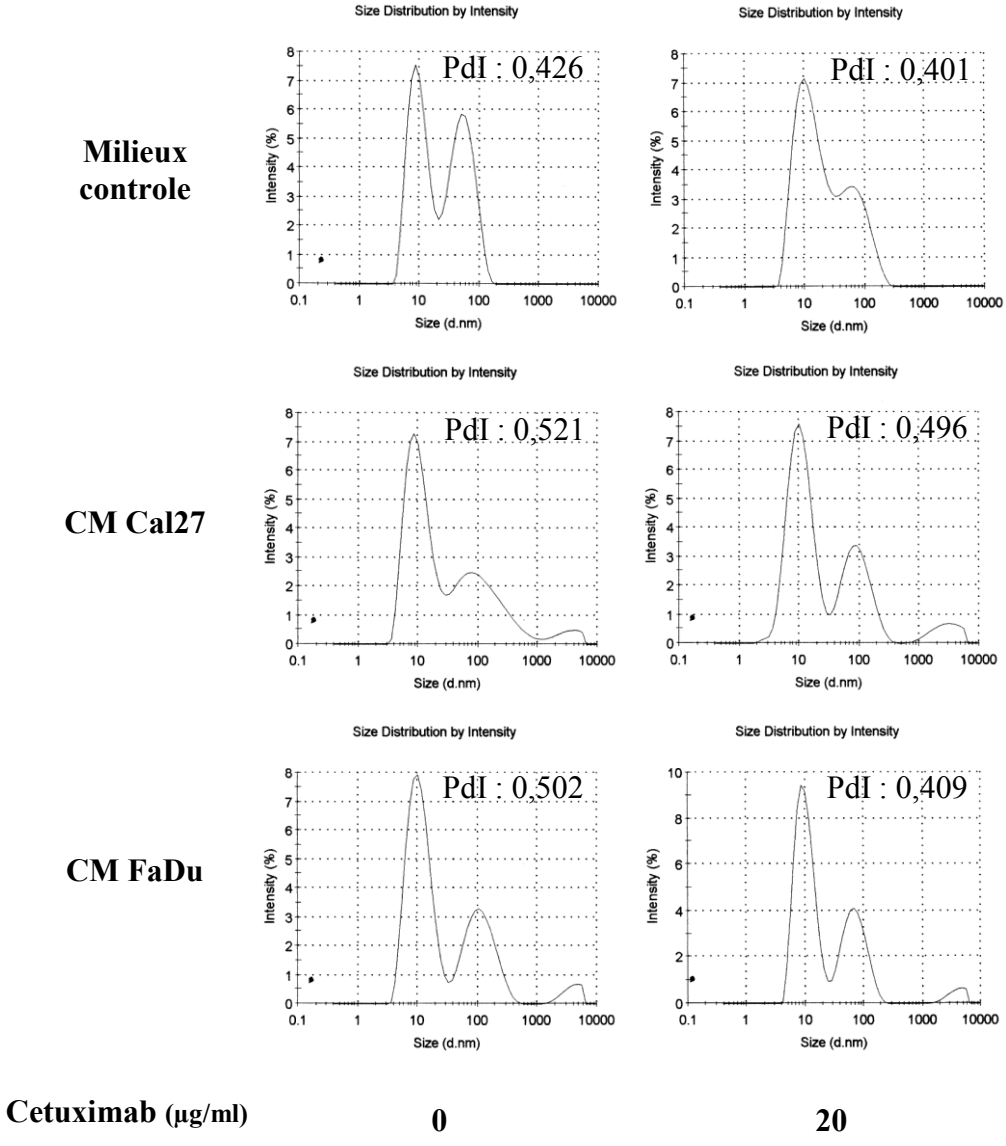


Figure 110 : Détection par la technique de diffusion de la lumière (DLS) des microvésicules : analyse de la distribution de la taille des TMV présentes dans les milieux contrôles et les milieux conditionnés (CM) obtenus après culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. Les figures données sont représentatives de 4 séries d'analyses. PdI = indice de polydispersité.

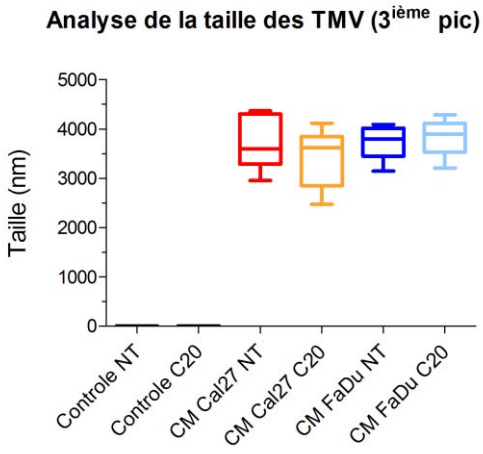


Figure 111 : Mesure de la taille des microvésicules par la technique de diffusion dynamique de la lumière (DLS) : analyse de la taille des TMV présentes dans les milieux contrôles et les différents milieux conditionnés (CM) obtenus après culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (n=4).

L'appareil utilisé (Zétasizer NanoZS) est capable de mesurer avec précision la taille d'une suspension monodisperse c'est-à-dire d'une suspension homogène de billes dont la taille est comprise dans un intervalle étroit de valeur. Une suspension monodisperse ne contient donc qu'un seul type de microvésicules. Dans notre cas, la présence de particules de différentes tailles perturbe la mesure. La valeur obtenue est donc faussée et ne reflète pas la taille réelle des microvésicules. Cependant, des auteurs ont mesuré la taille de microvésicules plaquettaires à l'aide de deux appareils dont le Zétasizer NanoZS utilisé ici (299). La taille mesurée par ces auteurs était du même ordre de grandeur que celle obtenue avec nos échantillons (entre 3600 et 4200 nm). Les valeurs obtenues sont donc cohérentes avec celles trouvées dans la littérature.

Pour de prochaines études nous devrons utiliser un sérum complètement déplété en microvésicules (quelle que soit leur taille) par centrifugation à 100000 g. Ainsi, nous serons en mesure d'évaluer en plus des TMV, la présence d'exosomes relargués par les cellules tumorales. De plus, cela nous permettra peut-être d'obtenir une valeur de taille des TMV correspondant mieux à la réalité. De même, si les suspensions de TMV obtenues sont plutôt monodisperses, nous pourrons également effectuer des mesures de potentiel zéta et de poids moléculaire sur ces échantillons. Nous serons alors en mesure d'évaluer des modifications de charge ou de masse à la surface des TMV, variations résultant d'une différence d'expression de certaines protéines membranaires.

La présence des TMV dans les CM a été confortée par les analyses de cytométrie en flux qui montrent la présence d'événements dont la taille est située en dessous de 0,9 µm (Cf. figure 112). Comme attendu, très peu d'événements ont été retrouvés dans les milieux contrôles et ceux-ci proviennent vraisemblablement de l'agrégation de protéines lors de l'incubation à + 37°C ou ayant lieu lors de la décongélation du sérum déplété en microvésicules (SVFd). Ce faible nombre d'événements peut également provenir d'une déplétion insuffisance du sérum de veau fœtal en microvésicules. Il faudrait peut-être effectuer une centrifugation supplémentaire à 14000 g.

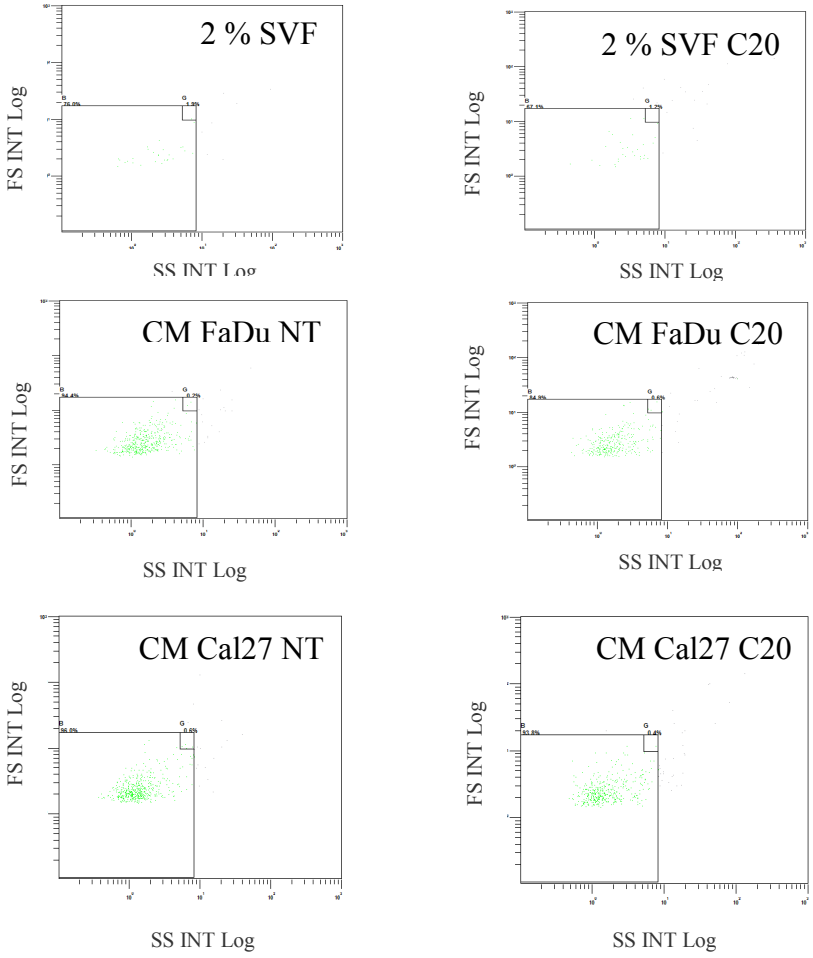


Figure 112 : Détection par cytométrie en flux des microvésicules : effet du cetuximab. Analyse des TMV présentes dans les milieux contrôles et les milieux conditionnés (CM) obtenus après culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. Représentation de la structure (FS) en fonction de la taille (SS), échelle logarithmique.

II. Effet du cetuximab sur le relargage des TMV:

Le relargage des microvésicules par les cellules tumorales a été quantifié par la mesure du nombre d'événements comptabilisés pendant les 300 secondes de l'analyse. Cette valeur a été rapportée à un nombre de microvésicules libérées dans 1 mL de milieu conditionné en considérant que le volume prélevé par l'appareil correspondait à 50 µL de suspension (soit le volume total analysé au débit lent de 10 µL/min) (Cf. figure 113).

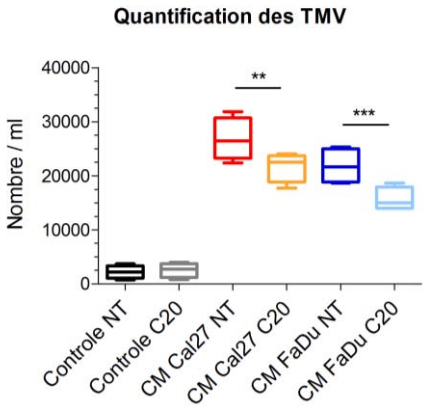


Figure 113 : Effet du cetuximab sur la libération des TMV : analyse par cytométrie en flux du nombre de TMV contenues par mL de milieux contrôles ou de milieux conditionnés obtenus après culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=4 en duplicat, $p<0,05$).

Les milieux contrôles possèdent une quantité négligeable d'événements correspondant à des microvésicules (NT : 2215 ± 439 ; C20 : 2560 ± 485 TMV/mL) comparativement au nombre d'événements obtenu avec les milieux conditionnés issus des deux lignées tumorales exposées ou non au cetuximab.

Lors de leur culture, les cellules Cal27 libèrent plus de microvésicules que les cellules FaDu (26790 ± 1667 et 21830 ± 1185 TMV/mL respectivement). Mais ce nombre diminue significativement lorsque les cellules tumorales sont exposées au cetuximab, et ce, quelle que soit la lignée utilisée (-19 % et -28 % respectivement). Ce nombre de TMV relarguées par les cellules tumorales après traitement reste malgré tout très élevé et supérieur au nombre de d'événements présents dans les milieux contrôles.

III. Effet du cetuximab sur l'expression de protéines membranaires à la surface des lignées et des TMV :

En hématologie, il est recommandé de confirmer l'existence et la qualité des microvésicules par la recherche de l'exposition des phosphatidyl sérines présentes sur le feuillet externe de la membrane par quantification de la liaison de l'Annexine-V à leur surface. Depuis quelques temps, la présence de l'annexine-V sur les microvésicules a été remise en question par des travaux montrant que certaines microvésicules n'exprimaient pas l'annexine-V. Néanmoins, nous avons tenu à vérifier la présence de l'annexine-V sur nos TMV.

Ensuite, afin de préciser l'origine tumorale des microvésicules, l'expression d'EPCAM a été recherchée à leur surface par la technique de cytométrie en flux. Nous avons également recherché l'expression d'EGFR et de TF afin de caractériser le rôle potentiel des TMV dans le transport de ces récepteurs. L'expression d'EGFR, de TF et d'EPCAM à la surface des cellules Cal27 et FaDu ont bien évidemment été évaluées par la même technique.

III.1. Annexine-V :

L'annexine-V est une protéine liant les phospholipides en présence de calcium et possède une grande affinité pour la phosphatidyl sérine (PS). Ce marqueur est généralement utilisé pour détecter les cellules qui sont entrées dans la voie de l'apoptose. L'intensité du marquage par l'annexine-V des cellules Cal27 et FaDu n'est pas différente de celle obtenue avec les cellules contrôles non marquées ; le marquage est donc négatif (Cf. figure 114).

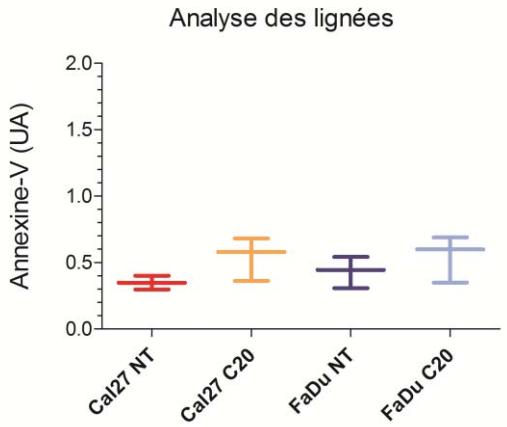


Figure 114 : Effet du cetuximab sur le marquage des cellules tumorales avec l'annexine-V : représentation de l'intensité moyenne de marquage des cellules Cal27 et FaDu exposées ou non à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3 ; $p<0,05$).

Physiologiquement, les microvésicules sont formées après activation des cellules et exposent la PS sur le feuillet externe de leur membrane. Ainsi, les techniques d'analyses des microvésicules plaquettaires utilisent le marquage à l'annexine-V comme marqueur pour les discriminer. Seulement, de nombreuses études récentes montrent que toutes les microvésicules ne fixent pas l'annexine-V (300-301).

L'analyse de l'intensité de marquage de nos TMV montre que la phosphatidyl sérine est présente à leur surface contrairement aux cellules dont elles sont issues, mais néanmoins de façon faible (intensité moyenne de fluorescence (IFM) 2,5 UA) (Cf. figure 115 vs figure 114). Le cetuximab n'influence pas l'intensité de ce marquage.

Nos résultats montrent que toutes les microvésicules tumorales ne fixent pas l'annexine-V. Les TMV issues des cellules FaDu présentent un pourcentage de marquage significativement plus important que celles issues des cellules Cal27 (40 % vs 19 % respectivement). L'exposition des lignées tumorales au cetuximab n'a pas d'effet, ni sur l'intensité de la fixation de l'Annexine V, ni sur le pourcentage de TMV marquées. Le cetuximab n'a donc pas d'effet sur l'exposition de la phosphatidyl sérine à la surface des TMV.

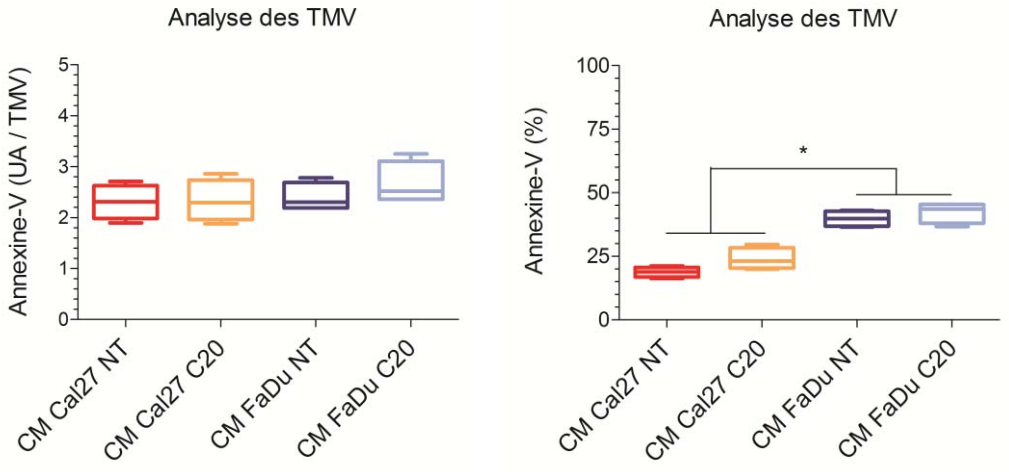


Figure 115 : Expression de l'annexine-V à la surface des TMV : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de TMV marquées (à droite) issues de la culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=4, $p<0,05$).

Ainsi, les TMV issues des Cal27 exposent plus faiblement la phosphatidylsérine à leur surface comparativement aux FaDu. Les caractéristiques membranaires de ces deux types de TMV semblent donc être différentes.

III.2. EGFR :

Les HUVEC présentent une surexpression d'EGFR après culture avec les milieux conditionnés issus des carcinomes épidermoïdes des VADS surexprimant le récepteur EGFR. Nous avons donc évalué l'expression de ce récepteur à la surface des cellules tumorales et des TMV afin de savoir si les TMV pouvaient être responsables de cette surexpression.

Les résultats de l'analyse de l'expression d'EGFR à la surface des lignées tumorales sont présentés dans la figure 116. Les cellules Cal27 présentent une intensité de marquage significativement plus élevée que celle des cellules FaDu (23 ± 1 vs 13 ± 1 UA respectivement). Ceci est en accord avec les résultats de western blot réalisés au laboratoire qui ont montré que les cellules Cal27 surexprimaient plus EGFR par rapport aux FaDu (non présenté). L'exposition des lignées tumorales au cetuximab induit une légère diminution de l'intensité de marquage des Cal27 mais pas celle des FaDu. Cependant, quelle que soit la lignée utilisée, 100 % des cellules tumorales exposent EGFR et le cetuximab n'a pas d'effet sur le pourcentage de cellules marquées. Le cetuximab induit donc une diminution du nombre de récepteurs présents à la surface des cellules Cal27 mais n'a pas d'effet sur celui des cellules FaDu.

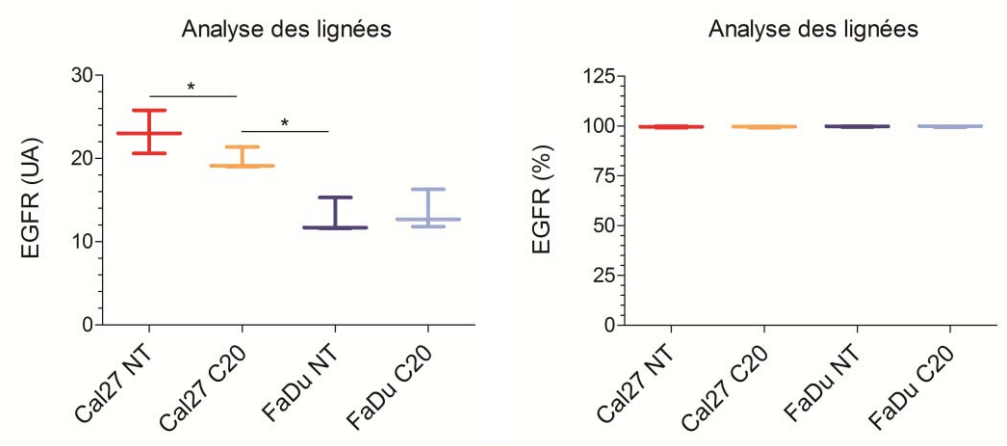


Figure 116 : Expression d'EGFR à la surface des lignées cellulaires : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de marquage (à droite) des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3, $p<0,05$).

Lorsque l'on s'intéresse aux TMV, on s'aperçoit que les microvésicules expriment EGFR ; elles sont donc capables de le transporter. De plus, l'intensité du marquage EGFR obtenu avec les TMV des deux lignées n'est pas significativement différente (Cf. figure 117). Cependant, le pourcentage de TMV exposant EGFR est supérieur lorsqu'elles sont issues des Cal27.

Ceci est en accord avec la différence d'intensité observée avec les lignées dont les TMV sont issues. Le cetuximab diminue significativement le pourcentage de TMV-Cal27 portant EGFR mais pas celui des TMV-FaDu.

Ainsi, ces résultats suggèrent que le cetuximab ne diminue pas le nombre de sites EGFR présents à la surface des microvésicules tumorales mais seulement le nombre de TMV-Cal27 portant ce récepteur.

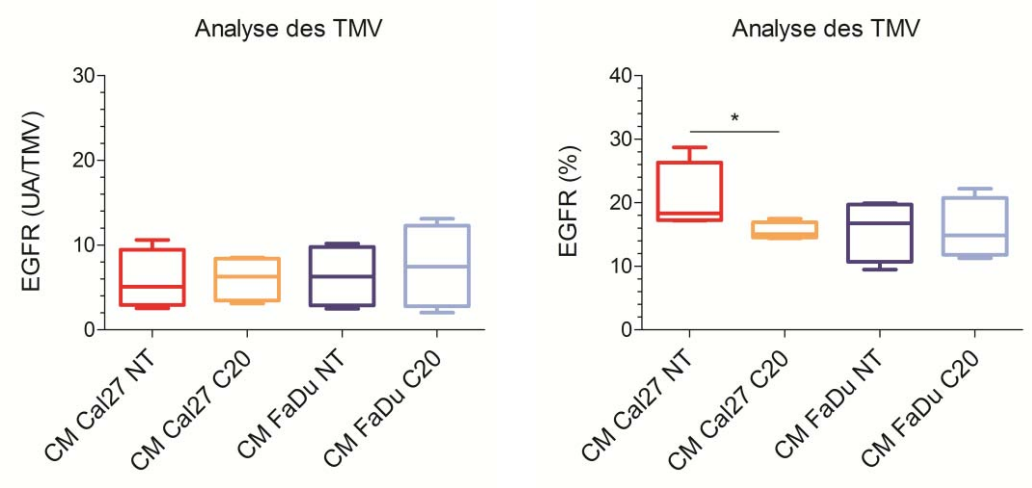


Figure 117 : Effet du cetuximab sur l'expression d'EGFR à la surface des TMV : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de marquage (à droite) des TMV issues de la culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=4, $p<0,05$).

III.3. EPCAM :

EPCAM est une molécule d'adhésion des cellules épithéliales et est surexprimée dans les carcinomes épidermoïdes des VADS. C'est pourquoi nous avons analysé son expression à la surface des lignées cellulaires, puis sur celle des TMV afin de signer leur origine cellulaire.

L'intensité de marquage est identique pour les deux lignées Cal27 et FaDu (Cf. figure 118). De plus, toute la population des cellules Cal27 et des cellules FaDu exposent EPCAM. Ce marqueur surexprimé dans les cellules épithéliales est bien retrouvé sur la membrane de nos lignées. Le cetuximab n'a pas d'influence sur l'expression de ce marqueur quelle que soit la lignée considérée.

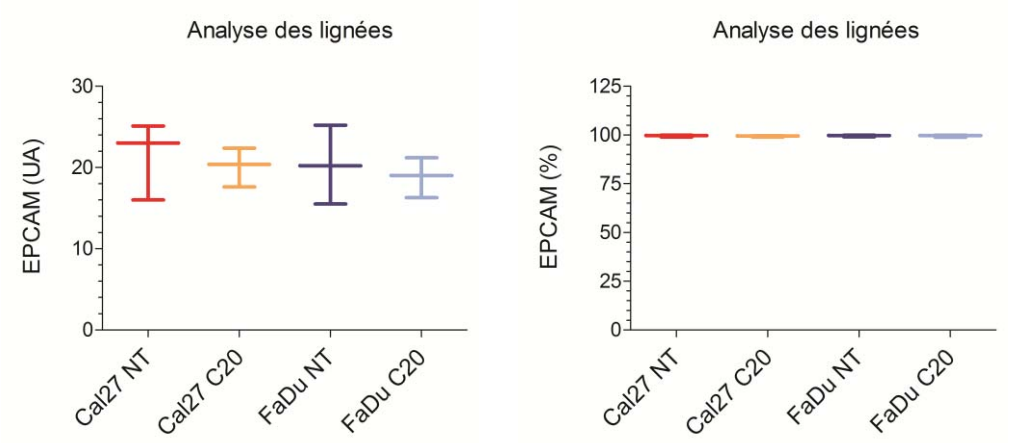


Figure 118 : Effet du cetuximab sur l'expression d'EPCAM à la surface des lignées cellulaires : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de marquage (à droite) des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3, $p<0,05$).

Bien qu'EPCAM soit fortement exprimée à la surface des lignées cellulaires, aucun marquage n'a été trouvé à la surface des TMV issues de ces cellules. Cette protéine ne semble donc pas être incorporée lors de la libération des TMV par les cellules tumorales. EPCAM ne pourra donc pas être utilisée pour témoigner de l'origine cellulaire des TMV. Ceci est en accord avec la littérature qui rapporte que certains marqueurs de la cellule d'origine ne sont pas retrouvés dans les microvésicules (193).

III.4. TF :

Le facteur tissulaire est une protéine impliquée dans la coagulation sanguine. Il joue également un rôle dans la progression des cancers par sa disposition transmembranaire qui lui confère le pouvoir d'activer de nombreuses voies de signalisation protumorales y compris pro-angiogéniques. Il n'existe pas sous forme soluble, c'est pourquoi l'ayant retrouvé dans nos milieux conditionnés, nous avons voulu vérifier son expression à la surface des TMV. Au préalable, nous avons étudié son expression sur nos lignées tumorales Cal27 et FaDu et les résultats des analyses sont présentés dans la figure 119.

Comme supposé, le TF est bien retrouvé à la surface des cellules Cal27 et des FaDu, l'intensité du marquage étant tout de même plus faible chez les cellules Cal27 par rapport aux cellules FaDu. Néanmoins, le pourcentage de cellules marquées est identique pour ces deux lignées et proche de 100 %. Le nombre de molécules présentes à la surface des cellules Cal27 est donc significativement inférieur à celui des cellules FaDu.

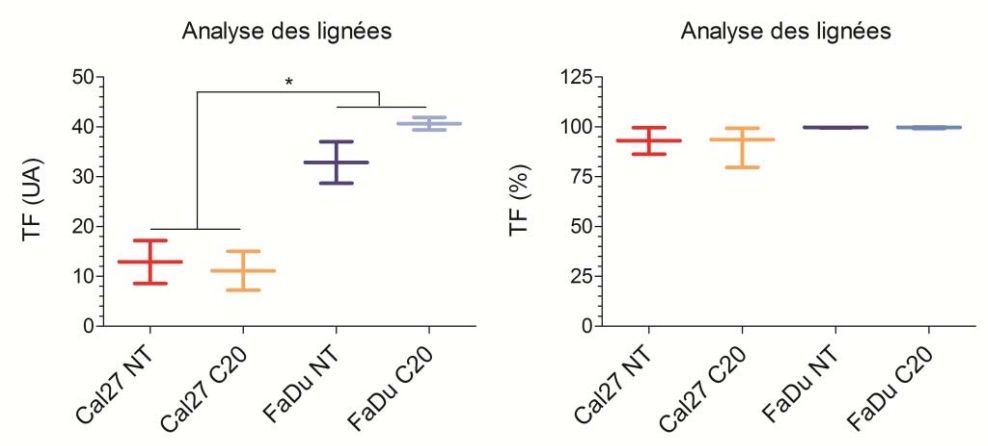


Figure 119 : Effet du cetuximab sur l'expression de TF à la surface des lignées cellulaires : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de marquage (à droite) des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3, $p<0,05$).

Les résultats de l'analyse de l'expression de TF à la surface des TMV sont présentés dans la figure 120.

Le marquage du TF présent à la surface des TMV-Cal27 est relativement faible aussi bien du point de vue de l'intensité que du pourcentage de marquage des TMV ; ce pourcentage de TMV portant TF est néanmoins différent du contrôle isotypique (TMV-Cal27 : 4,0 ± 0,5 % ; contrôle isotypique : 0,2 ± 0,2).

L'analyse du marquage des TMV issues des FaDu montre une intensité de marquage comparable à celle des TMV-Cal27 mais avec un pourcentage de TMV portant TF supérieur (11 ± 2 % pour les TMV-FaDu versus 4,0±0,5% pour les TMV-Cal27). L'exposition des cellules tumorales au cetuximab n'a pas d'influence sur l'expression de ce marqueur à la surface des TMV libéres par ces cellules.

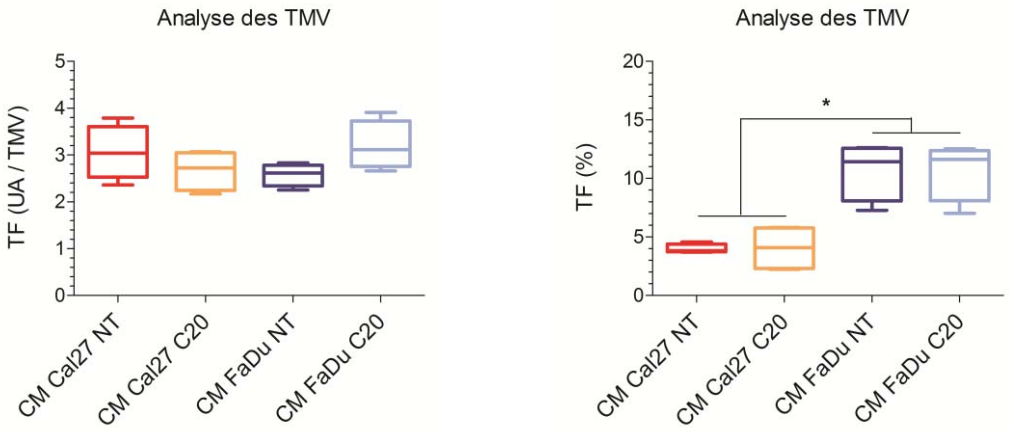


Figure 120 : Effet du cetuximab sur l'expression de TF à la surface des TMV : représentation de l'intensité moyenne (à gauche) et du pourcentage de marquage (à droite) des TMV issus de la culture des cellules Cal27 et des FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3, $p<0,05$).

En résumé, comme attendu, les lignées tumorales surexpriment EGFR, TF et EPCAM mais à des degrés différents selon la lignée utilisée (Cf. tableau 23) ; les cellules Cal27 surexpriment plus EGFR que les cellules FaDu et inversement pour l'expression du TF. Aucune de ces deux lignées n'est capable de lier l'annexine-V. L'expression d'EPCAM est identique pour ces deux lignées cellulaires.

Les TMV issues de ces lignées sont également différentes conformément à l'expression des cellules dont elles sont issues (Cf. tableau 23): les TMV-Cal27 expriment plus d'EGFR à leur surface alors que les TMV-FaDu surexpriment plus le TF. EPCAM n'a pas été trouvée à la surface de ces TMV et ne pourra pas servir de marqueur tumoral permettant de suivre l'évolution des TMV dans le sang des patients.

Echantillon	Cal27		FaDu	
Marqueur	Cellule	TMV	Cellules	TMV
Annexine-V	-	++	-	++++
EGFR	++	++	+	+
TF	++	+/-	++++	+
EPCAM	++	-	++	-

Tableau 23 : Tableau récapitulatif de l'expression d'EGFR, du TF et d'EPCAM à la surface des cellules Cal27 et FaDu et des TMV libérées par ces cellules.

IV. Risque thrombotique des TMV

D'après les résultats obtenus en cytométrie en flux, les TMV issues des cellules Cal27 sont pauvres en TF contrairement aux TMV issues des FaDu. Il nous a donc paru intéressant d'évaluer l'activité biologique pro-coagulante du facteur tissulaire présent à la surface des TMV par la technique de génération de thrombine.

La cinétique de libération de la thrombine générée lorsque l'on ajoute du TF, des PL et du calcium à un plasma pauvre en plaquette est évaluée en présence des milieux conditionnés contenant les microvésicules tumorales et permet d'apprécier l'apport global des TMV, par comparaison avec les milieux contrôles. L'activité assurée par le TF ou les PL présents sur les microvésicules tumorales est évaluée en éliminant l'un ou l'autre de ces facteurs du système.

IV.1. Apport global :

L'apport global des TMV en TF et en PL est mesuré en présence de tous les éléments nécessaires à la génération de la thrombine (TF, PL, calcium). Un exemple de cinétique de génération de la thrombine obtenue lors de l'analyse de nos différents milieux conditionnés est donné dans la figure 121 et les valeurs moyennes des paramètres calculés sont présentées dans le tableau 24.

Le temps de latence observé lors de l'analyse des milieux contrôles est très nettement diminué en présence de TMV quelle que soit la lignée cellulaire d'origine (environ 3 fois) ; le pic et l'aire sous la courbe (ETP) sont également très significativement augmentés par rapport aux échantillons contrôles (x 2 et 1,3 respectivement). Ceci indique que nos TMV sont capables d'activer le système de coagulation, et ce, de manière très rapide et de manière importante. De manière surprenante, les TMV-Cal27 exprimant très peu de TF montrent une activité comparable aux TMV issues des FaDu. Le cetuximab ne semble pas influencer l'activité pro-coagulante de ces TMV quelle que soit leur origine cellulaire.

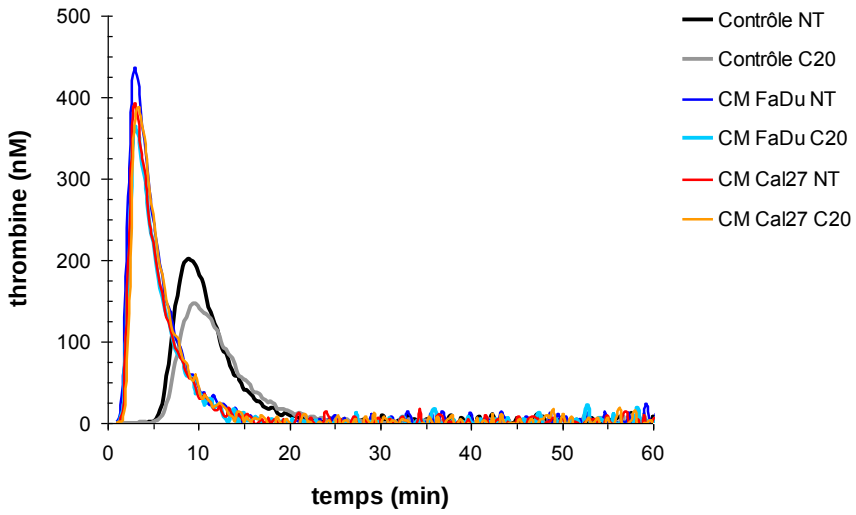


Figure 121 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport global des TMV en PL et en TF.

Condition	Contrôle		CM Cal27		CM FaDu	
Paramètre	NT	C20	NT	C20	NT	C20
LagTime (min)	6.1±0.1	6.3±0.2	1.4±0.3	1.7±0.3	1.9±0.3	1.9±0.2
Pic (nM)	179±45	168±25	370±6	379±6	380±47	344±18
ETP (nM min)	1177±89	1172±99	1550±87	1620±84	1657±223	1502±119

Tableau 24 : Effet de l'apport global des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie : valeur moyenne obtenue pour les différents paramètres mesurés : le temps de latence (LagTime), la concentration maximale de thrombine (Pic) et l'aire sous la courbe (ETP) (N=3).

IV.2. Apport en PL :

L'apport en PL des TMV est mesuré en présence de tous les éléments nécessaires à la génération de thrombine à l'exception des PL. Un exemple de cinétique de formation de la thrombine et les valeurs moyennes des paramètres calculés pour les différentes préparations sont présentés dans la figure 122 et le tableau 25 respectivement.

La quantité de thrombine générée au cours du temps est plus faible lorsque l'on enlève les PL du système, l'étape d'activation/amplification étant plus longue en absence de PL.

Cependant, cette génération de thrombine induite par les TMV reste très importante en absence de PL exogène, et ce, quelle que soit leur lignée cellulaire d'origine. De même, le temps de latence reste très court comparativement à celui observé pour les milieux contrôles et n'est pas influencé par l'exposition des cellules au cetuximab.

La valeur du pic et de l'ETP sont très nettement supérieurs en présence de TMV comparativement aux échantillons contrôles (Cf. figure 123). Mais, malgré des valeurs d'ETP identiques, la valeur du pic de thrombine généré par les TMV issues des Cal27 est significativement plus élevée par rapport à celle obtenue avec les TMV issues des FaDu (x 1,3) lorsque les lignées tumorales sont exposées au cetuximab. Le cetuximab n'influence pas cette activité quelle que soit la lignée utilisée.

Ces résultats suggèrent que les PL de ces TMV sont un excellent support pour la coagulation.

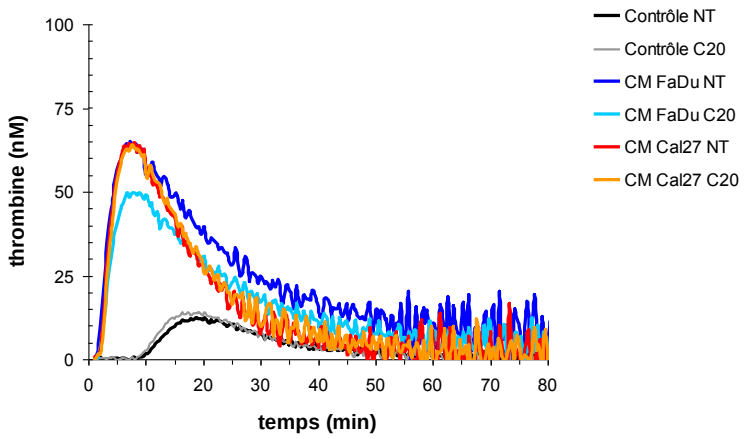


Figure 122 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport en PL des TMV.

Condition	Contrôle		CM Cal27		CM FaDu	
Paramètre	NT	C20	NT	C20	NT	C20
LagTime (min)	9.9±1.0	9.5±1.1	2.1±0.4	2.4±0.3	2.6±0.5	2.8±0.3
Pic (nM)	14±5	16±4	76±11	74±9	61±3	51±3
ETP (nM min)	310±95	344±68	1216±42	1276±73	1473±361	1259±153

Tableau 25 : Effet de l'apport en PL des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie : valeur moyenne obtenue pour les différents paramètres mesurés : le temps de latence (LagTime), la concentration maximale de thrombine (Pic) et l'aire sous la courbe (ETP) (N=3).

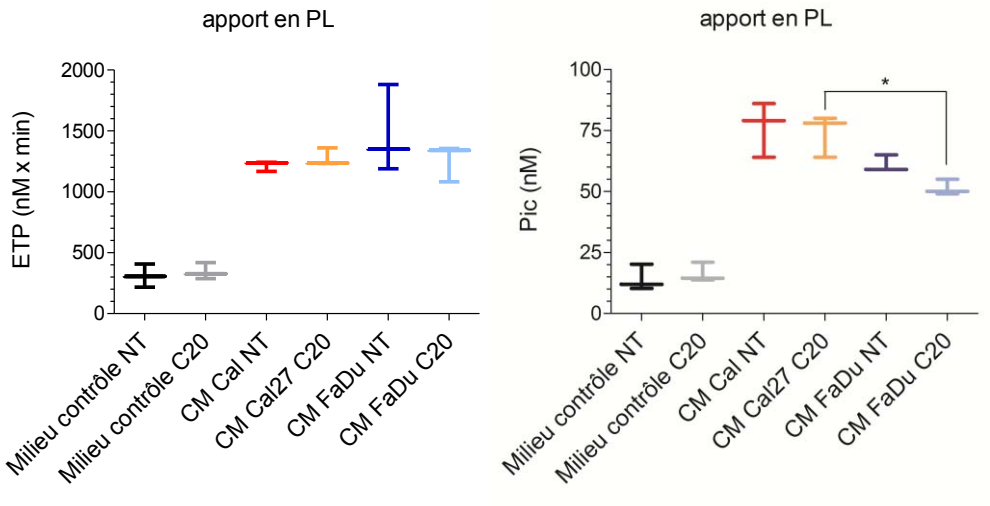


Figure 123 : Effet des microvésicules tumorales dans la génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport global des TMV en PL par mesure de l'aire sous la courbe (ETP, nMxmin) et de la concentration en thrombine générée (nM).

IV.3. Apport en TF :

L'apport en TF des TMV est mesuré en présence de tous les éléments nécessaires à la génération de thrombine à l'exception du TF. Un exemple de cinétique de formation de la thrombine et les valeurs moyennes des paramètres calculés pour les différentes préparations sont présentés dans la figure 124 et le tableau 26 respectivement.

Les valeurs du temps de latence, du pic et de l'ETP observées sont comparables aux valeurs obtenues dans le système complet et restent toujours très différentes en présence de TMV par rapport aux milieux contrôles. Il n'y a pas de différence observée pour les différents paramètres calculés entre les TMV issues des deux lignées (Cf. tableau 26). Le FT apporté par les TMV est très efficace pour activer la génération de thrombine sans PL dans le système et le cetuximab n'a pas d'effet significatif sur cette activité.

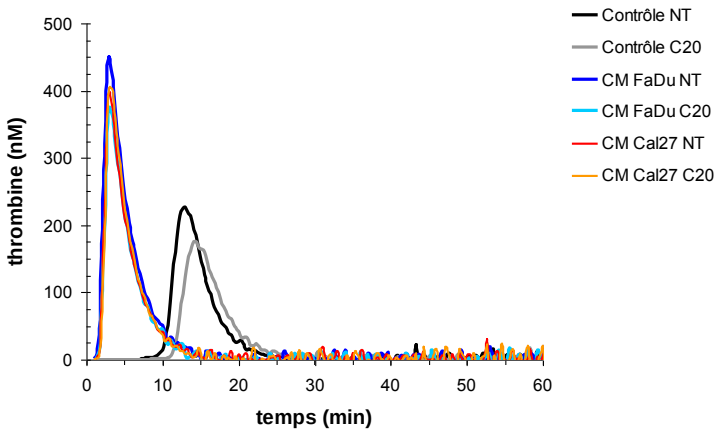


Figure 124 : Exemple de cinétique de génération de la thrombine mesurée par thrombinographie : analyse de l'apport en TF des TMV.

Condition	Contrôle		CM Cal27		CM FaDu	
Paramètre	NT	C20	NT	C20	NT	C20
LagTime (min)	13.7±5.9	11.2±2.2	1.4±0.3	1.7±0.3	1.9±0.3	2.0±0.4
Pic (nM)	197±61	193±57	371±11	393±5	386±53	355±12
ETP (nM min)	1117±142	1127±85	1540±113	1601±155	1662±214	1503±117

Tableau 26 : Effet de l'apport en TF des TMV sur la génération de thrombine mesurée par thrombinographie : valeur moyenne obtenue pour les différents paramètres mesurés : le temps de latence (LagTime), la concentration maximale de thrombine (Pic) et l'aire sous la courbe (ETP) (N=3).

En résumé, les TMV apportent à la fois une part de PL (par l'intermédiaire de leur membrane) et une quantité suffisante de TF actif permettant la formation de thrombine dans un système clos. La différence dans le niveau d'expression du TF par les TMV issues des deux lignées ne modifie pas leur capacité à générer de la thrombine. De plus, les TMV-Cal27 semblent apporter une part de PL supplémentaire par rapport aux TMV-FaDu.
Ceci est en contradiction avec les résultats de cytométrie en flux qui montrent un pourcentage plus faible de PS sur la face externe des TMV marquées à l'annexine-V. Ceci peut s'expliquer par le fait que d'autres PL comme la phosphatidyl choline (PC) ou la phosphatidyl éthanolamine (PE) sont également impliqués dans la formation de thrombine. D'ailleurs, on trouve ces PL dans le réactif PPP Low utilisé pour effectuer les tests (ce réactif contient 20% phosphatidylsérine, 20% phosphatidyl éthanolamine and 60% phosphatidyl choline).
La part supplémentaire de PL apportée par les TMV-Cal27 peut également être due à une plus faible expression protéique à la surface de ces TMV comme semble l'évoquer l'expression de TF à la surface de ces TMV analysées par cytométrie en flux.

V. Interaction des TMV avec les EC :

Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les TMV peuvent transmettre le récepteur EGFR aux cellules endothéliales en culture, nous avions, dans un premier temps, vérifié, par cytométrie en flux, le niveau d'expression d'EGFR à la surface des cellules HUVEC cultivées pendant 48 heures en présence des milieux contrôles ou des milieux conditionnés contenant les TMV.
Cette expérience n'a pas été concluante et nous n'avons pas pu détecter la présence d'EGFR à la surface des cellules endothéliales. Ceci peut être expliqué par le fait que :

- les TMV n'expriment pas EGFR et ne peuvent donc pas le transmettre aux cellules endothéliales,
- les TMV sont endocytées par les cellules endothéliales : dans ce cas, la membrane des TMV ne fusionne pas avec la membrane des cellules endothéliales,
- le nombre de récepteur EGFR présent à la surface des TMV est trop faible,
- ou que l'incorporation des TMV par les HUVEC est trop faible…

Nous avons quand même tenté de vérifier la présence d'interactions entre les TMV et les cellules HUVEC après marquage des TMV par un fluorophore (DiO). Le DiO est un

marqueur des phospholipides et s'insère dans la membrane des cellules. Ainsi, lors de la formation des microvésicules, une partie du DiO est incorporée dans les TMV.

Dans un premier temps, nous avons vérifié le marquage des TMV par le DiO puis nous avons évalué la capture de ce marqueur par les cellules HUVEC après culture dans les différents milieux conditionnés contenant ces TMV-DiO par cytométrie en flux (Navios) et imagerie en flux (Amnis).

V.1. Marquage des TMV par le DiO :

Les cellules Cal27 et FaDu ont été marquées de façon similaire par le DiO (93 % et 95 % respectivement) avant d'être ensemencées dans les boites de culture servant à fabriquer les milieux conditionnés (Cf. figure 125). L'intensité du marquage cellulaire est également identique pour les deux lignées (8 vs 7 UA pour les Cal27 et les FaDu respectivement).

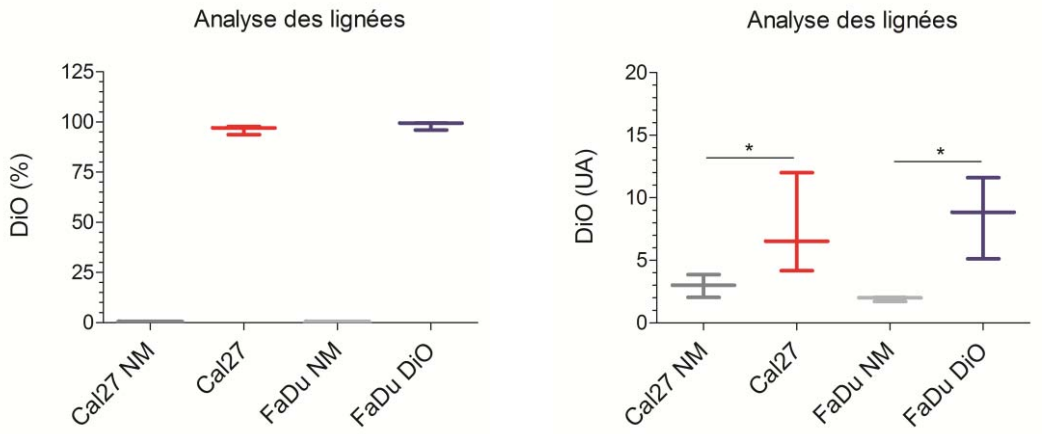


Figure 125 : Marquage des lignées cellulaires Cal27 et FaDu au DiO : pourcentage des cellules marquées à gauche ; intensité du marquage à droite (* : $p<0,05$ n=3).

L'analyse des CM issus des deux lignées marquées au DiO montre qu'environ 1/3 des TMV sont marquées par le DiO (36 % et 32 % pour les TMV-Cal27 et TMV-FaDu respectivement) (Cf. figure 126). Ceci provient probablement du fait que le DiO est transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire. Le DiO se retrouve dilué au fils des générations et le marquage des TMV issues des cellules filles devient moins intense. Il n'y a pas de différence significative dans l'intensité du marquage obtenu avec les TMV issues des deux lignées cellulaires.

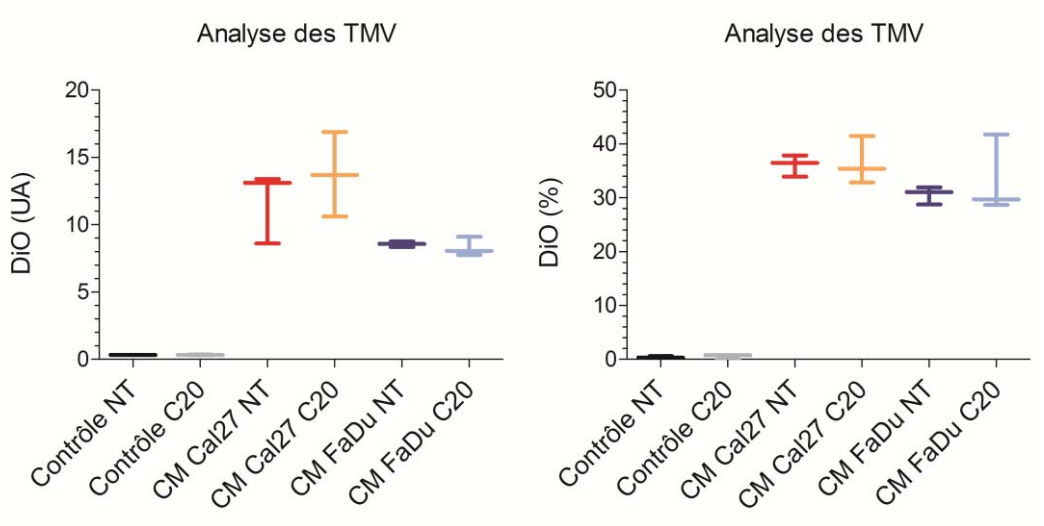


Figure 126 : Marquage des TMV au DiO par cytométrie en flux: intensité moyenne (à droite) et pourcentage de marquage (à gauche) des TMV libérées dans les milieux conditionnés après culture des cellules Cal27 et FaDu exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=3).

V.2. Analyse des interactions par cytométrie en flux

Pour vérifier la capacité qu'ont les cellules endothéliales à interagir avec les TMV, nous avons étudié l'émission de fluorescence par les cellules HUVEC après culture dans les milieux conditionnés contenant les TMV marquées au DiO.

Après 24 heures de culture, un certain nombre de cellules HUVEC sont capables d'acquérir la fluorescence provenant des TMV-Cal27 marquées au DiO (5 % des HUVEC) contrairement aux TMV-FaDu qui interagissent faiblement avec les HUVEC. En effet, le pourcentage de cellules HUVEC marquées en présence des TMV-FaDu n'est pas statistiquement différent de celui obtenu avec les milieux contrôles (Cf. figure 127).

Lorsque l'on regarde les valeurs d'intensité de marquage, on se rend compte que les cellules HUVEC sont marquées de la même façon après incubation avec les TMV-Cal27 et TMV-FaDu. Ainsi, on peut dire que les HUVEC interagissent avec les TMV issues des Cal27 et beaucoup plus faiblement avec les TMV-FaDu. Le cetuximab n'influence pas les interactions entre les HUVEC et les TMV après 24 heures d'incubation.

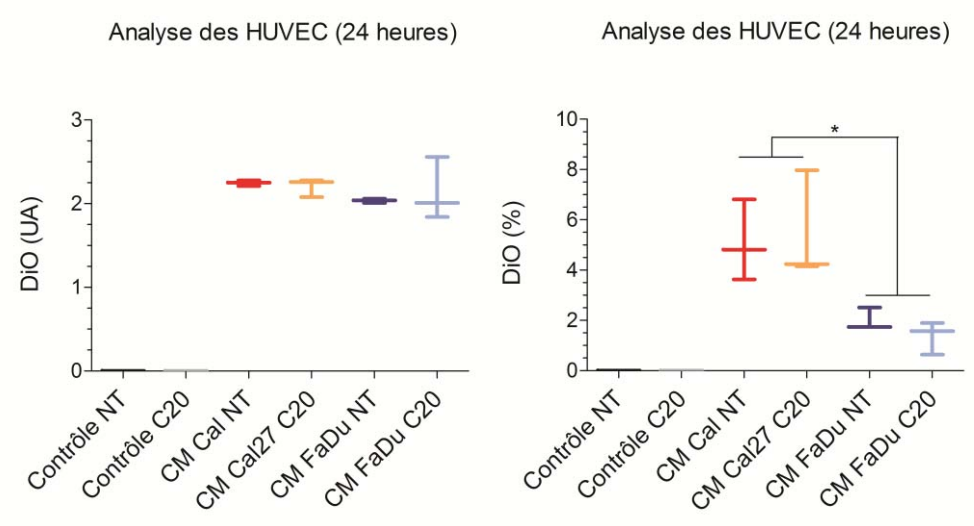


Figure 127 : Mesure par cytométrie en flux des interactions entre les TMV et les cellules endothéliales : intensité moyenne (à gauche) et pourcentage de marquage (à droite) des cellules HUVEC après 24 heures d'incubation avec les TMV présentes dans les milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 et FaDu marquées au DiO et exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (n=3).

Pour vérifier l'interaction des HUVEC avec les TMV-FaDu nous avons augmenté le temps d'incubation. Après 48 heures de culture, le nombre de cellules HUVEC marquées par le DiO augmente après culture avec les TMV-Cal27 mais pas avec les TMV-FaDu, comparativement aux valeurs obtenues après 24 heures d'incubation (Cf. figure 128). De plus, après 48 heures d'incubation, le cetuximab semble diminuer les interactions des HUVEC avec les TMV-Cal27. Mais il faudrait augmenter le nombre d'essais pour savoir si ces différences sont significatives. L'intensité de fluorescence émise par les cellules HUVEC marquées avec les TMV-DiO après 24 heures d'incubation est identique à celle obtenue après 48 heures d'incubation et n'est pas influencée par le cetuximab.

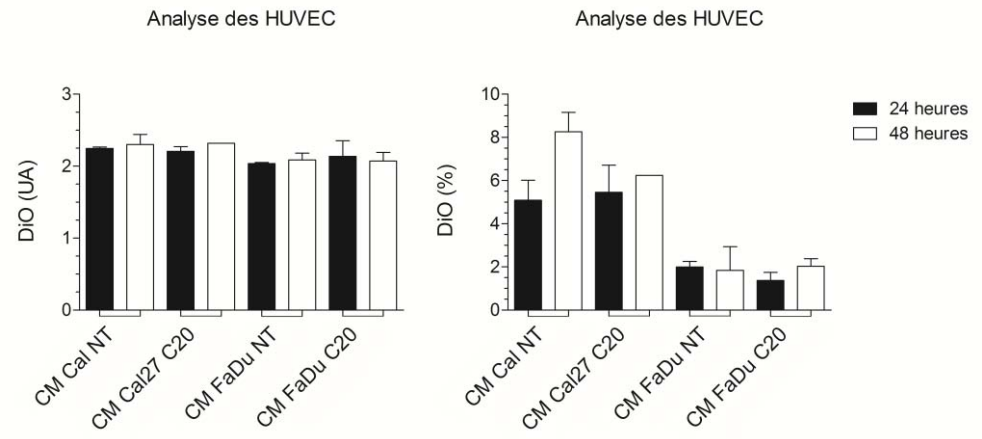


Figure 128 : Effet du temps d'incubation sur les interactions entre les TMV et les cellules endothéliales par cytométrie en flux : intensité moyenne (à gauche) et pourcentage (à droite) de marquage des HUVEC après 24 heures (en noir) et 48 heures (en blanc) d'incubation avec les TMV présentes dans les milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 et FaDu marquées au DiO et exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (n=2).

Ainsi, les TMV semblent capables d'interagir avec les cellules HUVEC mais de manière plus importante si elles sont issues des cellules CAL27. Cette interaction augmente au cours du temps. Seulement, ces événements sont rares et il faudrait utiliser une méthode plus sensible afin de pouvoir étudier plus précisément les variations ; c'est pourquoi nous avons essayé de visualiser ces interactions avec une nouvelle technique : l'imagerie en flux.

V.3. Analyse des interactions par imagerie en flux

Les interactions entre les HUVEC et les TMV marquées au DiO ont été observées après 24 heures d'incubation par imagerie en flux (Amnis). Cette technique permet non seulement d'obtenir des paramètres quantitatifs mais également une image de chaque cellule analysée. Les résultats présentés ici concernent des essais préliminaires.
Les cellules HUVEC cultivées pendant 24 heures avec les TMV issues des Cal27 et des FaDu présentent une intensité de fluorescence supérieure aux cellules HUVEC cultivées avec les milieux contrôles (Cf. figure 129). Le cetuximab n'influence pas l'intensité de marquage des HUVEC.

Le pourcentage de cellules marquées est plus important quand les HUVEC sont incubées avec les TMV-Cal27 par rapport aux TMV-FaDu et est influencé par le cetuximab (Cf. tableau 27). En effet, le pourcentage de cellules HUVEC marquées augmente lorsqu'elles sont cultivées en présence de TMV-Cal27 exposées au cetuximab mais semble diminuer en présence des TMV-FaDu exposées à cet agent. Seulement, le nombre d'essai est assez faible et il faudrait faire quelques expérimentations supplémentaires afin de pouvoir procéder à des analyses statistiques.

Condition	MP Cal27 NT-DiO	MP Cal27 C20-DiO	MP FaDu NT-DiO	MP FaDu C20-DiO
Marquage HUVEC (%)	11,2 11,8	21,9 25,4	13,3	9,24

Tableau 27 : Mesure des interactions entre les TMV et les cellules HUVEC par imagerie en flux : expression du marquage (%) des HUVEC cultivées en présence des TMV issues de la culture des cellules Cal27 et FaDu marquées au DiO et exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab. (N=1 pour TMV-FaDu, N=2 pour TMV-Cal27).

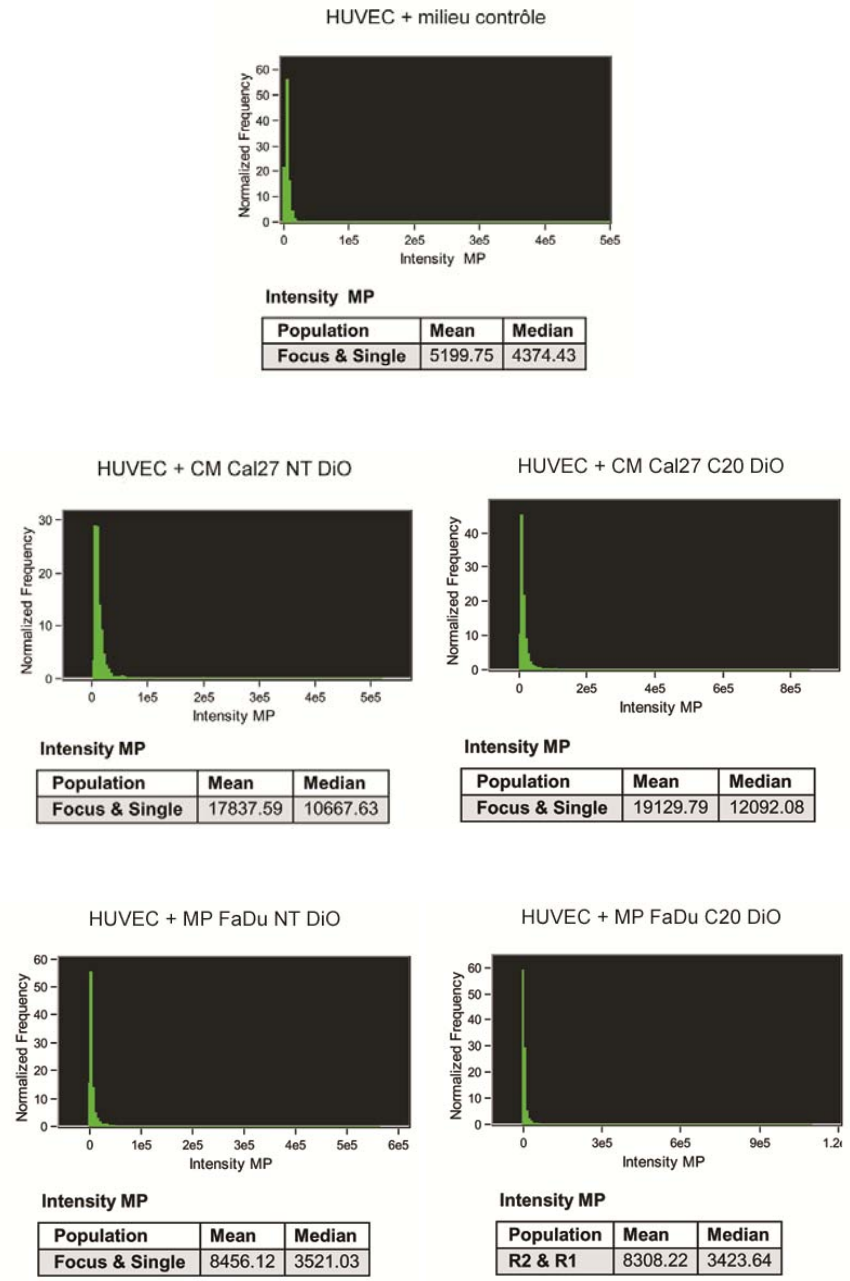


Figure 129 : Mesure par imagerie en flux des interactions entre les TMV et les cellules endothéliales : intensité de marquage des HUVEC après 24 heures d'incubation avec les TMV présentes dans les milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 et FaDu marquées au DiO et exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab pendant 48 heures. (N=2 pour TMV-Cal27 et N=1 pour TVM-FaDu).

Les images prises par imagerie en flux lors de l'observation des HUVEC après incubation avec les différents milieux contenant les TMV-DiO sont présentées dans la figure 130. Le canal BF (Bright field) permet de visualiser les cellules avec une lumière blanche comme un microscope à contraste de phase ; le canal DiO correspond au marquage des cellules avec le DiO ; le canal BF/DiO représente la superposition de ces deux canaux et enfin le canal SSC permet de visualiser les granulations cellulaires.

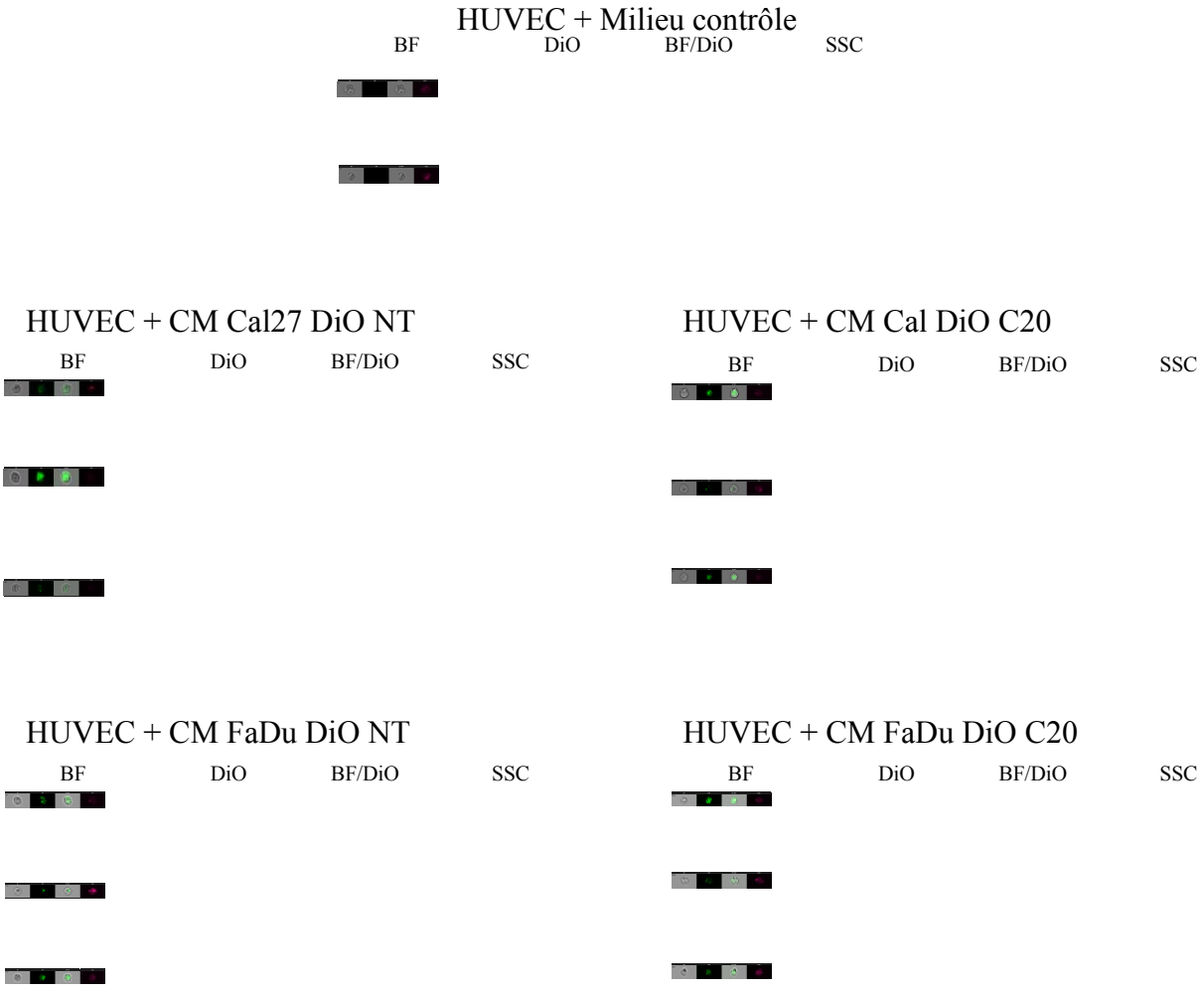


Figure 130 : Etude par imagerie en flux de l'effet du cetuximab sur les interactions entre les TMV et les cellules endothéliales : observation des HUVEC après 24 heures d'incubation avec les TMV présentes dans les milieux conditionnés issus de la culture des cellules Cal27 et FaDu marquées au DiO et exposées (C20) ou non (NT) à 20 µg/mL de cetuximab. (Objectif x40).

Lors de ces essais préliminaires, nous avons essayé de marquer le noyau des cellules HUVEC avec le marqueur nucléaire DAPI et la membrane de ces cellules avec le marqueur membranaire CD44. Seulement ces marquages ne nous ont pas donné satisfaction (Cf. figure 131). Ils doivent être améliorés afin de pouvoir déterminer la localisation du marquage induit pas les TMV-DiO à l'aide des fonctions de co-localisation inclus dans le logiciel d'analyse.

HUVEC + CM Cal27 DiO NT

BF DiO BF/DiO CD144 CD144/DiO SSC



HUVEC + CM Cal27 DiO C20

BF DiO BF/DiO CD144 CD144/DiO SSC

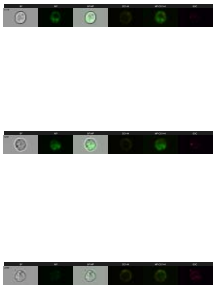


Figure 131 : Observation par imagerie en flux des HUVEC après 24 heures d'incubation avec les milieux conditionnés contenant les TMV marquées au DiO, HUVEC également marquées avec un anti-CD144-PE (objectif x40).

Ainsi, cette technique d'imagerie en flux nous a permis de montrer que les HUVEC sont capables d'interagir avec les TMV issues des cellules tumorales Cal27 et FaDu, toutefois avec plus d'affinité avec les TMV Cal27. Le cetuximab utilisé lors de la fabrication des CM semble avoir un effet sur ces interactions, peut-être en modifiant la composition membranaire de ces TMV. Le marquage se présente sous forme de points mais peut également apparaître de manière plus diffuse. Il n'est pas encore possible de savoir si ces TMV sont incorporées dans la membrane des HUVEC ou s'ils entrent par endocytose à l'intérieur de la cellule. Il ne semble pas qu'ils soient à l'extérieur de la cellule car cela formerait un halo ou des points à l'extérieur des HUVEC (au dessus de la membrane) mais des études ultérieures sont nécessaires pour le confirmer. Des analyses par microscopie confocale permettraient de

localiser avec précision les TMV au niveau du compartiment cellulaire après fusion avec les HUVEC (membrane, cytoplasme, noyau).

VI. Discussion :

L'étude du relargage des microvésicules issues des cellules tumorales des cancers des VADS est une étude préliminaire visant à évaluer leur implication dans l'effet pro-angiogénique observé lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence des milieux conditionnés issus de la culture des cellules tumorales exposées au cetuximab.

Dans un premier temps, nous avons essayé de caractériser ces microvésicules par microscopie électronique. Mais, comme d'autres auteurs l'ont déjà rapporté, les centrifugations sont néfastes pour ces structures et ont généré de nombreux artefacts (302). Nous avons donc utilisé une méthode simple pour démontrer l'existence de ces microvésicules dans nos milieux conditionnés en utilisant la technique de diffusion dynamique de la lumière. Seulement l'appareil utilisé n'est pas capable de mesurer avec précision la taille de microparticules présentes dans une solution polydisperse comme c'est le cas avec nos milieux conditionnés. Ainsi, nous avons continué cette étude en utilisant la technique de cytométrie en flux qui permet la détection de petits événements après calibration de l'appareil à l'aide de billes fluorescentes de différentes tailles (303-304).

Les analyses effectuées par cytométrie en flux montrent la présence de microvésicules dans nos milieux conditionnés. En effet, l'équipe de Bergmann a montré la présence de TMV dans le sérum de patients atteints de tumeurs des VADS (215). Toutes les TMV ne lient pas l'annexine-V alors que ce marqueur est couramment utilisé comme référence pour la détermination des microvésicules plaquettaires (305). Mais ceci a également été rapporté par d'autres auteurs (300, 306, 307).

Nos résultats montrent que le cetuximab induit une diminution du relargage des TMV quelle que soit la lignée utilisée. Ainsi, la numération des TMV pourrait permettre de suivre l'efficacité des traitements chez les patients atteints de tumeurs des VADS comme cela a déjà été évoqué lors du traitement par chimiothérapie à base de docetaxel de différentes tumeurs de la prostate (308) en suggèrant un rôle de biomarqueur potentiel pour ces TMV (212, 231,

309). De plus, une méthode basée sur la détection des oncogènes présents à la surface des TMV et permettant le diagnostic des cancers, le suivi de la progression de la maladie et de l'efficacité thérapeutique des traitements a fait l'objet d'un dépôt de brevet (Brevet de R. JAanusz et al, - European: A61K45/06; G01N33/574T; G01N33/574V2). Une étude pilote concernant la détection des TMV chez des patients atteints ou non de cancer de la vessie a montré que la composition en protéine des TMV peut potentiellement être utilisée pour la détection précoce de ces cancers (310). Toutefois, il faudra au préalable trouver un bon marqueur permettant de discriminer les microvésicules tumorales des autres microvésicules relarguées par les cellules vasculaires et retrouvées dans le sérum. L'équipe de Skog J. et al a montré la présence de TMV issues de glioblastomes portant une mutation spécifique d'EGFR (232). De même l'équipe de Tesselaar a montré une plus faible survie chez les patients possédant un plus grand nombre de microvésicules à activité pro-coagulante (311). C'est pourquoi nous avons étudié l'expression de différents récepteurs à la surface de ces TMV comme EGFR et le facteur tissulaire (TF).

Nos résultats montrent que les TMV issues des deux lignées sont différentes mais que l'expression des différents récepteurs retrouvés à leur surface est en accord avec l'expression de ces marqueurs observée chez les lignées dont elles sont issues, à l'exception d'EPCAM.
En effet, EPCAM n'a pas été détecté à la surface des TMV malgré sa présence à la surface des cellules d'origine. De plus, la présence d'EPCAM a été trouvée à la surface d'exosomes tumoraux (312-313) et montre bien une différence de formation des différents types de microvésicules. De plus, ce résultat confirme le caractère sélectif de l'incorporation des protéines dans les TMV (193).

Le facteur tissulaire est présent à la surface des TMV et est capable d'induire la formation de thrombine (314-315). Cette activité du TF à la surface des microvésicules a également été montrée par d'autres équipes (316). Néanmoins, les phospholipides de la membrane des TMV participent également à cette activité en donnant un support membranaire pour la formation du thrombus.

Le récepteur EGFR a été trouvé à la surface des TMV comme l'ont déjà montré Al-Nedawi et al. avec la technique de western blot (217). De plus, les TMV issues des Cal27 sont capables d'interagir avec les HUVEC. Ce genre d'interaction a déjà été montré par l'équipe d'Al-Nedawi dans un modèle *in vivo* utilisant une technique de microscopie de fluorescence (217).

Cette interaction semble augmenter lorsque les TMV sont issues des cellules tumorales exposées au cetuximab. Toutefois, ces résultats montrent que les CM-Cal27 sont capables de véhiculer le récepteur EGFR vers les cellules endothéliales par le biais des TMV. Des études complémentaires sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'incorporation des TMV dans les CE afin de pouvoir confirmer leur implication dans l'effet pro-angiogénique observé avec les CM issus de la culture des cellules CAL27 exposées au cetuximab. De plus, le contenu des TMV (facteurs de croissance, microARN) devrait être étudié car il pourrait expliquer l'effet des CM issus de la culture des FaDu, cellules qui semblent agir de manière différente des Cal27.

Les TMV transportent de nombreux récepteurs membranaires mais également des protéines solubles jouant un rôle dans l'angiogenèse. En effet, Taraboletti et al. ont montré la présence de VEGF dans les microvésicules, VEGF pouvant induire la migration des CE et la formation de tubes pseudo-capillaires (317). D'autres facteurs pro-angiogéniques comme le FGF-2 et l'IL-8 peuvent être retrouvés dans ces microvésicules ainsi que des petits acides nucléiques comme des ARNm codant pour le VEGF, l'HGF ou l'IL-8 (197).

L'équipe de Taraboletti a également montré un effet dose-dépendant des microvésicules sur l'angiogenèse (194). En effet, de fortes concentrations sont plutôt inhibitrices alors qu'un faible taux est plutôt stimulateur. Ceci peut expliquer l'augmentation du réseau vasculaire induit par l'exposition des cellules tumorales au cetuximab. Des études sont donc nécessaires pour évaluer l'effet de ces TMV dans l'angiogenèse afin de déterminer leur implication dans l'effet pro-angiogénique observé.

Chapitre 4 : Conclusion et perspectives

Le but de cette thèse était d'évaluer l'effet des thérapies ciblées sur l'angiogenèse induite par les cellules tumorales. En effet, les anticorps ciblant EGFR diminuent la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales. Le VEGF est un facteur pro-angogénique par excellence, c'est pourquoi un effet anti-angiogénique a été attribué à ces agents thérapeutiques mais sans étudier réellement leur effet dans l'angiogenèse.

Les travaux effectués dans la première partie ont permis d'évaluer l'effet d'un agent anti-angiogénique direct ciblant VEGFR-2 sur l'activité métabolique et la viabilité des HUVEC et également sur l'angiogenèse dans un modèle *in vitro* de culture de cellules endothéliales sur matrice. L'agent testé, le tartrate de thiénopyrimidinone ou EPS4, induit une forte inhibition de l'activité métabolique des HUVEC mais sans affecter leur viabilité après 24 heures de culture. De plus, cette nouvelle molécule est capable d'inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF dès 3 μM. Des études ultérieures sont maintenant nécessaires pour confirmer la diminution de l'activation du récepteur par l'évaluation du niveau de phosphorylation des différents résidus tyrosine présents dans le domaine tyrosine kinase de ce récepteur. De plus, la structure de la molécule doit être améliorée afin d'augmenter son affinité et d'obtenir une IC_{50} de l'ordre du nanomolaire, comme c'est le cas pour les molécules en cours de développement. De plus, cela permettra d'utiliser de plus faibles doses lors des études d'évaluation de l'activité anti-tumorale de cette molécule chez la souris nude.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons évalué l'activité angiogénique du cetuximab. Cet anticorps ciblant EGFR n'a pas d'effet significatif sur l'activité métabolique et la viabilité des cellules endothéliales et induit une légère diminution de la formation du réseau pseudo-capillaire. Nous avons montré que la diminution de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales n'induit pas forcément un effet anti-angiogénique dans notre modèle de formation de tubes pseudo-capillaires *in vitro*. Ceci a

également été confirmé dans un modèle un peu plus complexe d'angiogenèse : la culture d'anneau aortique de souris (Thèse Jihane Mriouah, 8 Nov 2010). L'évaluation de l'expression de 55 protéines impliquées dans l'angiogenèse n'a pas permis de déterminer un marqueur spécifique capable de prédire l'effet de ces milieux conditionnés sur l'angiogenèse. Nous avons également montré que les milieux conditionnés issus de la culture des cellules tumorales exposées au cetuximab étaient capables de moduler l'expression du récepteur EGFR par les cellules endothéliales, ceci malgré une expression membranaire très faible de ce récepteur à la surface des cellules endothéliales.

L'équipe d'Al-Nedawi ayant montré l'acquisition d'EGFR par les cellules endothéliales après capture de microvésicules, nous avons consacré la dernière partie de ces travaux de thèse à l'évaluation de ces particules microscopiques. Les résultats ont montré la présence de microvésicules dans les milieux conditionnés et leur possible implication dans l'effet pro-angiogénique observé. Le relargage de ces microvésicules après exposition des cellules tumorales au traitement anti-EGFR est cohérent avec l'étude de Taraboletti qui a montré qu'un faible taux de microvésicules avait un rôle stimulateur de l'angiogenèse contrairement à un fort taux qui avait un rôle inhibiteur dans un modèle de formation de tubes pseudo-capillaires. De plus, les interactions entre les TMV-Cal27 et les cellules endothéliales semblent augmenter sous l'effet du traitement. Cette interaction peut être responsable de l'augmentation d'EGFR observée chez les HUVEC lorsqu'elles sont cultivées dans les milieux conditionnés. Le mécanisme semble être différent avec les TMV-FaDu puisque les interactions avec les cellules endothéliales ne semblent pas augmenter sous l'effet du traitement.
De plus, l'augmentation de l'interaction des TMV-Cal27 avec les cellules endothéliales sous l'effet du cetuximab montre la capacité de ces cellules tumorales à réagir vis-à-vis des agressions provoquées par le traitement dans le but de pouvoir continuer à se développer.

Des études complémentaires sont maintenant nécessaires pour évaluer l'effet de ces microvésicules dans l'angiogenèse afin de savoir si elles sont impliquées dans l'effet pro-angiogénique observé. Pour cela, nous allons utiliser des tubes à centrifuger contenant des filtres permettant de concentrer les échantillons en TMV en appliquant une vitesse peu élevée afin de ne pas abimer les microvésicules. Ainsi, nous serons en mesure d'étudier les effets de ces TMV sur l'angiogenèse en fonction de la dose utilisée. De plus, cela nous permettra d'effectuer des analyses protéomiques et de pouvoir identifier les différentes protéines

transportées par ces TMV. Ensuite, nous pourrons étudier l'effet des thérapies ciblées sur l'expression de ces différents marqueurs. Enfin, à plus long terme et après avoir trouvé un marqueur tumoral, nous pourrons évaluer l'efficacité des traitements par caractérisation des TMV libérées dans le sérum de patients atteints de carcinomes épidermoïdes des VADS.

Annexes

Microvascular Research xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab

Valérie Jouan-Hureaux [a], Cédric Boura [a], Jean-Louis Merlin [a,b], Béatrice Faivre [a,*]

[a] *EA 4421: SiGReTO (Signalisation, Génomique et Recherche Translationnelle en Oncologie), UHP-Nancy 1, Nancy Université, Faculté de Pharmacie, 5 Rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy cedex, France*

[b] *Unité de Biologie des Tumeurs, Centre régional de lutte contre le cancer Alexis Vautrin (CAV), Avenue de Bourgogne, 54511, Vandœuvre-lès-Nancy cedex, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 13 July 2011
Available online xxxx

ABSTRACT

Overexpression of EGFR plays a key-role in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and justifies the extensive use of cetuximab, a monoclonal anti-EGFR antibody, as well as EGFR-tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKI), which have been reported to inhibit tumor cell growth and the secretion of pro-angiogenic factors by tumor cells, such as VEGF and IL-8. Moreover, vessel normalization in tumors, suggesting a more complex mediation of endothelial cell growth control has also been observed *in vivo*.

The present study was designed to investigate the angiogenic consequences of exposure of HNSCC tumor cell lines to cetuximab and intercellular signaling between tumor and endothelial cells by secretion of pro- and anti-angiogenic mediators in the conditioned media (CM).

The results achieved showed that cetuximab decreased the secretion of VEGF by HNSCC cells and that exposure of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to CM from HNSCC cells exposed to cetuximab induced an increase in endothelial cell network formation. Angiogenesis proteome profiling showed that cetuximab induced a complex alteration of the secretion of pro- and anti-angiogenic factors by HNSCC cells without enabling to identify a unique molecular marker.

Expression of endothelial membrane receptors (VEGFR-2, EGFR, PECAM-1 and Notch-4) was investigated and only EGFR expression was found influenced when HUVEC were exposed to CM from cetuximab-exposed HNSCC cells.

These results showed that the decrease in the secretion of pro-angiogenic agents like VEGF by HNSCC cells exposed to cetuximab could not be sufficient to justify its anti-angiogenic activity *in vitro*.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Numerous human cancers overexpress EGFR such as gastrointestinal tract, colorectal, breast, lung, prostate, bladder, ovarian and head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). EGFR (Erb-1 or HER-1) is a member of human epithelial receptor (HER) tyrosine kinase family and implicated in the regulation of cellular proliferation, migration, differentiation and apoptosis in normal tissues. EGFR activation after ligand binding and subsequent phosphorylation is often associated with poor prognosis and decreased survival (Ang et al., 2002). For these reasons, EGFR inhibitors (Zhu, 2007) have been developed such as monoclonal antibodies targeting the extracellular domain of EGFR and tyrosine kinase inhibitor targeting EGFR catalytic domain (EGFR-TKI).

Cetuximab, a chimerical monoclonal antibody directed against EGFR has been approved for use in clinical practice in combination with radiation in patients with locally advanced HNSCC and as monotherapy for recurrent and metastatic HNSCC (Baselga and Eur, 2001; Bonner et al., 2006). Cetuximab competes with EGF or TGF-α for binding to EGFR, blocks ligand-induced dimerization of the receptor and the subsequent downstream PI3K and MAPK signaling pathways (Vincenzi et al., 2008). Moreover, cetuximab, by promoting receptor internalization, reduces the number of receptor available for ligand binding at the cell surface (Vincenzi et al., 2008). Cetuximab decreases the secretion of VEGF-A, IL-8 and FGF-2 by tumor cells *in vitro* and *in vivo* (Perrotte et al., 1999; De Luca et al., 2008; Viloria-Petit et al., 2001). Thus the anti-tumoral effects of cetuximab are known to be due to direct interactions with tumor cellular growth (proliferation, migration and apoptosis) (Vincenzi et al., 2008; Huang et al., 2002) and to indirect anti-angiogenic effects.

Angiogenesis is required for tumor progression and the development of metastasis. A number of pro- and anti-angiogenic factors regulate blood vessel formation. VEGF-A is the main potent pro-

Abbreviations: CM, conditioned media; EGFR, epidermal growth factor receptor; FCS, heat inactivated fetal calf serum; FGF-2, fibroblast growth factor-2; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IL-8, interleukin-8; PECAM-1, platelet endothelial cell adhesion molecule-1; VEGF-A, Vascular endothelial growth factor-A; VEGFR-2, Vascular endothelial growth factor receptor-2.

* Corresponding author at: EA 4421 SiGReTO, Faculté de Pharmacie, UHP-Nancy 1, 5 Rue Albert Lebrun, BP 80403, 54001 Nancy cedex, France.

E-mail address: Beatrice.Faivre@pharma.uhp-nancy.fr (B. Faivre).

0026-2862/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

ARTICLE IN PRESS

angiogenic molecule and promotes endothelial cell proliferation and migration. VEGF-A exerts potent mitogenic and prosurvival effects on endothelial cells and has been shown to be a key factor in pathologic situations that involve neovascularization and change in vascular permeability. During vessel sprouting, particular endothelial cells are selected by Notch and VEGFR-2 signaling and migrate through guidance by VEGF-A concentration gradient.

A link between EGFR and angiogenesis has been reported by Goldman et al. (1993) who showed that EGFR signaling might be implicated in the regulation of VEGF-A production in malignant glioma cells. Indeed, EGFR-null mice exhibited lower vessel density as compared to EGFR wild-type mice in skin carcinogenesis or skin grafts models (Casanova et al., 2002; Repertinger et al., 2004). EGFR is also implicated in the wound healing process. It has been showed that EGFR is particularly necessary for re-epithelialization and angiogenesis during wound repair (Repertinger et al., 2004). EGFR-TKI was reported to decrease VEGF-A, HB-EGF or amphiregulin transcription implicated in this process (Stoll et al., 1997). Finally, some studies suggested the possibility of a direct anti-angiogenic effect of anti-EGFR (Huang et al., 2002; Bozec et al., 2005) due to the expression of EGFR on tumor endothelial cells (Amin et al., 2006). Thus, the anti-angiogenic effect of the EGFR inhibitors could be due, in part, to an inhibition of the secretion of angiogenic factors by tumor cells and to another part by their direct interaction on tumor-associated endothelial cell but mechanisms are still unknown. However a synergic effect of chemo- and anti-angiogenic therapy was achieved by possible normalization of tumor vessels (Jain, 2001) enabling a better access to cytotoxic drugs.

Despite clinical benefit in some patients, clinical resistance to anti-EGFR agents has been described and correlated with overexpression of VEGF-A (Viloria-Petit et al., 2001). Thus, such data emphasize the need for response predictive markers to anti-EGFR drugs in HNSCC and particularly on angiogenesis. Consequently, a more detailed understanding of the molecular signals that govern the interactions between the tumor and endothelial cells will help to improve strategies for using anti-EGFR therapeutics not only for cancer treatment but also to prevent recurrence. In this context, we evaluated not only the direct impact of cetuximab on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) but also the impact of cetuximab on the signaling between HNSCC cell lines and HUVEC. For this purpose, we prepared conditioned media (CM) i.e. culture media harvested from cell culture of HNSCC cell lines (Cal27 and FaDu) and studied the effect of CM on cell viability and on endothelial cell network formation. Angiogenesis proteome profiling as well as endothelial cell expression of some receptors implicated in angiogenesis such as VEGFR-2, EGFR, PECAM-1 and Notch-4 was studied.

Material and methods

Endothelial cell culture

Umbilical cords were cut after delivery in compliance with relevant laws in respect with consent of women. Rapidly, human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were collected from umbilical cords as previously described by Jaffe et al. (1973). HUVEC were cultured and used until passage 5 in "HUVEC medium" consisting in 50% M199 (GibcoBRL, France) and 50% RPMI 1640 (v/v) (Sigma, France) supplemented with 20% heat inactivated human AB serum (EFS, Nancy, France), 2 mM L-glutamine (GibcoBRL), 100 U/ml penicillin (GibcoBRL, France), 100 µg/ml streptomycin (GibcoBRL, France), 2.5 µg/ml amphothericin B (GibcoBRL, France), and 20 mM HEPES (Sigma, France).

Conditioned media preparation (CM)

HNSCC cell lines (Cal27: human tongue squamous cell carcinoma; FaDu: human hypopharynx squamous cell carcinoma) were cultured in RPMI 1640 medium (GibcoBRL, France) (Sigma, France) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Dutscher, France), 2 mM L-glutamine (GibcoBRL), 100 U/ml penicillin (GibcoBRL, France) and 100 µg/ml streptomycin (GibcoBRL, France).

At 50% confluence, cultures of Cal27 or FaDu were exposed to 2% FCS with 0–2–20 µg/ml cetuximab (Erbitux®, Merck Serono, France) for 48 h. Then, the culture media were collected, centrifuged at 350 *g* and the supernatants were frozen at −20 °C until used (CM obtained from Cal27:CM Cal27; CM obtained from FaDu:CM FaDu). Samples from three independent cell cultures were pooled. Control medium was RPMI 1640 medium supplemented with 2% FCS with or without cetuximab. Protein content was evaluated using bicinchoninic acid assay (BCA™ protein assay kit, Thermo scientific, France).

Effect of cetuximab on endothelial cell viability

Viability was measured *via* the mitochondrial dehydrogenase activity of living cells (MTT assay). HUVEC were plated at 20,000 cells/cm^2 in 24 well plates in complete medium. After 24 h, the medium was changed and cells were cultured with cetuximab (0–100 µg/ml) in RPMI 1640 medium supplemented with 2% FCS during 48 h. Cells were incubated with 0.4 mg/ml of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, France) at 37 °C during 3 h. Formazan crystals were dissolute by dimethylsulfoxide (Fisher Scientific, France) and absorbance was measured at 570/630 nm (EL800 Universal microplate reader, Bio-Tek instrument, USA).

Endothelial cell network formation

HUVEC were plated (90,000 cells/cm^2) onto 24-well plate pre-coated with Matrigel® (BD Biosciences, France). After 1 h, media were removed and replaced by control or CM media and HUVEC were cultured during 24 h before being fixed with 4% paraformaldehyde.

Network formation was analyzed after phalloïdin-sulforhodamine staining (Fluoprobes®, Interchim, France). Photomicrographs (Nikon AZ100, Digital Sight DS-Qi1Mc camera, Nikon, France) were taken and whole wells were reconstituted using Grab image function of NIS element software (Nikon, France). Endothelial cell density was calculated with NIS Element Software and represented as the area fraction in relation to whole field. The total additive length of all cellular structures including all branches and the number of junctions was quantified with Angiosys Software (TCS Cellworks, UK).

Cytokines analysis in the conditioned media

VEGF-A concentration in CM was determined using sandwich bead immunoassay (Bioplex®, Biorad, France). Briefly, VEGF monoclonal antibody was covalently coupled to fluorescent beads. Beads were incubated with 6 µg of total protein and unbound molecules were removed. Anti-VEGF biotinylated antibody was added and detected after coupling to streptavidin–phycoerythrin using a dual-laser flow-based reader. The Bio-Plex software automatically calculates the concentration of cytokines from standard curves drawn from analysis of calibration standards.

Angiogenesis related proteins in CM were evaluated using Proteome Profiler™ Array assay (R&D Systems, France) according to the manufacturer recommendations. Briefly, specific antibodies have been spotted in duplicate on nitrocellulose membranes. 900 µg/ml of protein was mixed with biotinylated detection antibodies and incubated overnight with the array. After several washes and substrate addition, chemiluminescence was detected (Chemidoc, Biorad, France). For each spot, gray level density was determined by image analysis (Quantity One, Biorad, France) and the background level was subtracted. A signal to background noise ratio is three.

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

Effect of cetuximab on the secretion of each protein was calculated as percentage of variation from values measured in untreated control cell cultures.

Western blot analysis

HUVEC were allowed to grow in conditioned media with or without cetuximab. After 24 h of exposure, HUVEC cells were lysed with RIPA containing proteases inhibitor cocktail (complete, Roche, France) during 30 min and protein extracts were collected and kept frozen at −20 °C until analyzed. Protein concentration was quantified using BCA™ protein assay (Thermo Scientific, France). 25 μg of proteins obtained from HUVEC lysates were submitted to 8% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (100 V during 2 h). After protein migration, the gels were blotted onto a polyvinylidene fluoride membrane. The non-specific protein binding was blocked by soaking the membrane with blocking buffer for 1 h (5% fat free dried milk, 10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5). The membranes were incubated for 1 h at room temperature with blocking buffer and with anti-human, polyclonal β-tubulin (Santa Cruz, TEBU, France), monoclonal VEGFR-2 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), polyclonal EGFR (Cell Signaling Technologies, France), monoclonal PECAM-1 (DakoCytomation, France) and polyclonal Notch-4 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany). Detection was performed after incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) and the expression of the different proteins was measured with a chemiluminescent detection system (Chemidoc, Biorad, France) and analyzed by image analysis (Quantity One, Biorad, France). The results were normalized using β-tubulin as reference protein and given as relative expression from untreated cell protein extract values as reference.

Statistical analysis

All results were given as mean ± standard deviation (SD), except for western blotting where standard error of the mean (SEM) was used. Differences among groups were tested using variance analysis (ANOVA) followed by Bonferroni/Dunn test (Statview software 5.0) or PLSD Fisher for western blotting analysis. A value of $p<0.05$ was considered as statistically significant.

Results

Direct effect of cetuximab on endothelial cell viability

Endothelial cell viability was not influenced by cetuximab until 20 μg/ml (Fig. 1, see control media) but a 23% significant decrease in viability was achieved after exposure to 100 μg/ml of cetuximab (data not shown) Thus, in order to evaluate the impact of cetuximab on the signaling pathway between tumor and endothelial cells, we decided to work with 2 and 20 μg/ml of cetuximab, concentration that did not affect viability of endothelial cells.

Indirect effect of cetuximab on endothelial cell viability

A significant decrease in viability was observed as HUVEC were exposed to CM Cal27 or CM FaDu (−26% and −50% respectively) (Fig. 1). No significant influence of cetuximab was observed whatever the concentration and whatever the HNSCC line used.

Direct effect of cetuximab on endothelial cell tube formation

To evaluate whether cetuximab modified directly capillary structure formation, HUVEC were plated onto Matrigel® and allowed to grow in control medium with or without cetuximab (0–20 μg/ml).

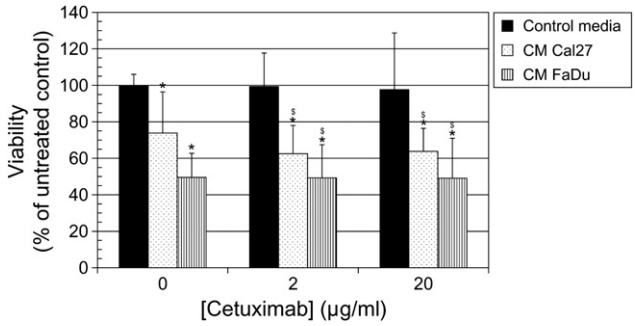


Fig. 1. Effect of conditioned media on endothelial cell viability. Viability (MTT assay) of HUVEC grown in control medium (■) or CM Cal27 (□) or CM FaDu (▥) with or without cetuximab (0–20 μg/ml) was measured after 48 h of exposure. Results are presented as percent of variation with values obtained for control medium without cetuximab as reference. (n = 4 in triplicate). Differences are considered as significant when $p<0.05$ using Bonferroni/Dunn test. *, versus control medium without cetuximab; $, versus control medium with cetuximab.

After 24 h of incubation, the formation of capillary structures decreased when endothelial cells were exposed to 20 μg/ml cetuximab (Fig. 2A see asterisks in control media) and this was consistent with the decrease in cell density, length and number of junction of the cellular network calculated from photographs (Figs. 2B, C and D).

Indirect effect of cetuximab on endothelial cell network formation

CM prepared with 2 μg/ml of cetuximab did not affect endothelial cell network formation but unexpectedly CM prepared with 20 μg/ml of cetuximab induced formation of numerous structures (Fig. 2A see arrows) especially with CM Cal27. Endothelial cells were organized into network exhibiting a lot of ramifications particularly with CM Cal27 obtained with 20 μg/ml cetuximab consistently with the increase in the number of junction (Fig. 2D). In addition, cell density was significantly increased in presence of 20 μg/ml of cetuximab (×2.2 or 1.6 for CM Cal27 and FaDu respectively as compared to control medium) (Fig. 2B), as well as the length of the cellular network (Fig. 2C).

Effect of cetuximab on angiogenesis mediators secreted by tumor cells

VEGF-A was not detected in control media (Fig. 3) but VEGF-A expression was found in CM and higher in CM Cal27 than CM FaDu (approx 4 folds). Moreover, the secretion of VEGF-A in CM decreased as cetuximab concentration increased from 2 to 20 μg/ml whatever cell lines used.

Then, to screen for factors secreted by tumor cells and implicated in the cetuximab "VEGF-A-independent pro-angiogenic effect", analysis of 55 angiogenesis mediators was performed in the conditioned media using Proteome profiler™ array. No angiogenesis mediator was detectable in cell free culture media. Analysis of arrays showed that Cal27 secreted a higher amount of molecules than FaDu (Fig. 4). ActivinA, ADAMTS-1, angiopoietin-1 and -2, angiostatin, artemin, CD26, EGF, EG-VEGF, CD105, endostatin, FGF-1, FGF-2, FGF-4, FGF-7, GDNF, HGF, IGFBP-1 and -3, IL-1β, TGF-β1, leptin, MIP-1α, MMP-8, NRG1-β1, PD-ECGF, PDGF-AB, persephin, PF-4, PIGF, prolactin, serpin B5, serpin F1, TIMP-4, TSP-2, vasohibin and VEGF-C were not detected on the arrays from both CM. Amphiregulin, HB-EGF, IGFBP-1, PDGF-AA and TSP-1 were detected under background level. Some proteins were expressed at a very low level close to the detection limit as angiogenin (ANG), tissue factor (TF), MMP-9 and pentraxin-3 (PTX-3) for Cal27 and CXCL-16, ET-1, MCP-1, GM-CSF and IGFBP-3 for FaDu.

In Cal27 cells, analysis of pixel intensity of each spot highlights that Cal27 exposed to 20 μg/ml cetuximab did not modify the secretion of some anti-angiogenic proteins like PAI-1 and TIMP-1 but decreased the secretion of PTX-3 (−35%) (Fig. 4A). The secretion of some pro-

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

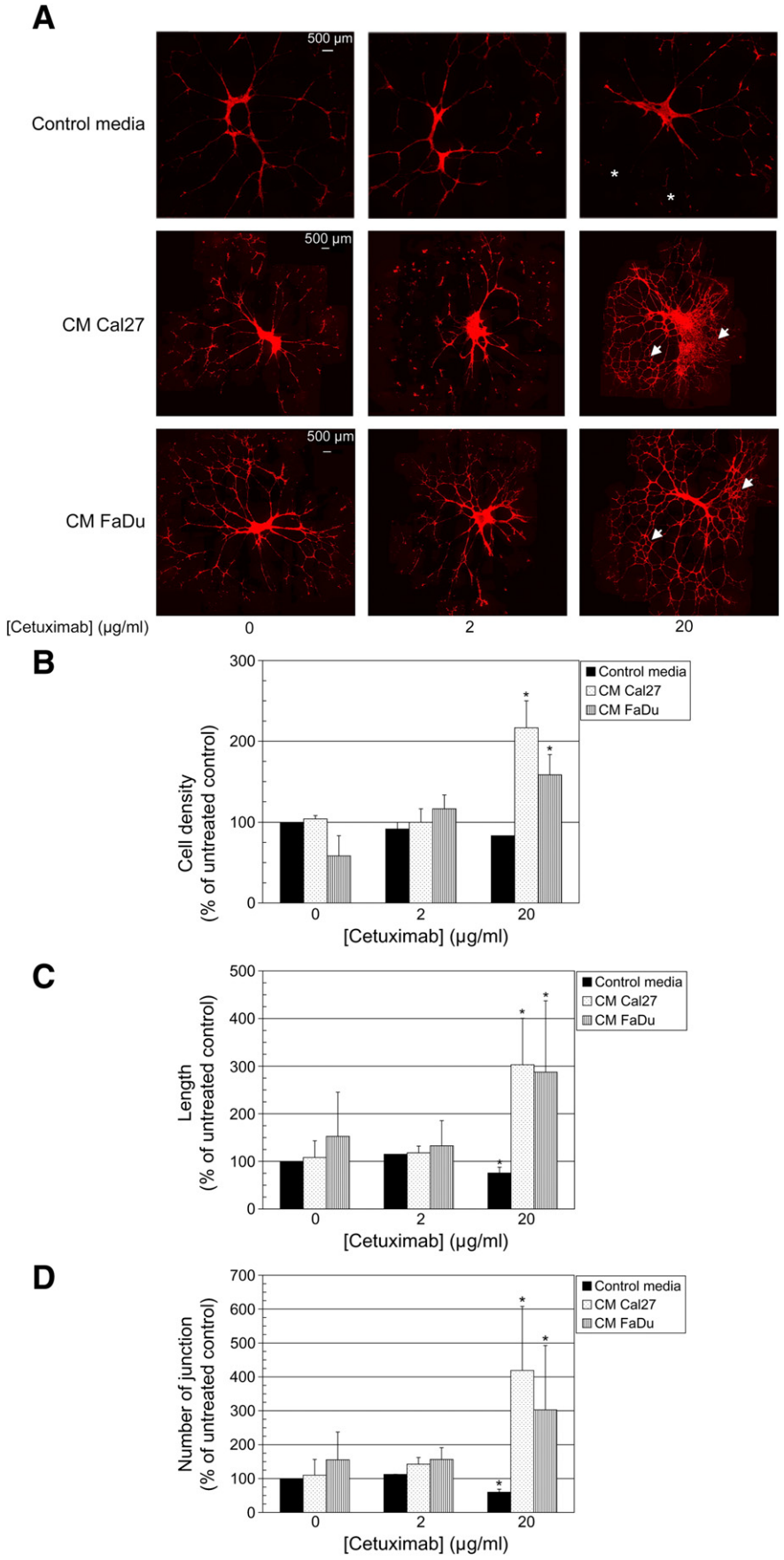


Fig. 2. Effect of conditioned media on endothelial cell tube formation. HUVEC were seeded onto matrigel® pre-coated wells and cultured in control medium (■) CM Cal27 (□) or CM FaDu (▥) prepared with or without cetuximab (0–20 µg/ml) for 24 h. Phalloidin-Sulfo-rhodamine staining (A). Cell density (B), length (C) and number of junction (D) of endothelial cell network are presented as percent of variation with values obtained for control medium without cetuximab as reference (n = 3). Differences are considered as significant when $p<0.05$ using Bonferroni/Dunn test. *Versus control medium without cetuximab.

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

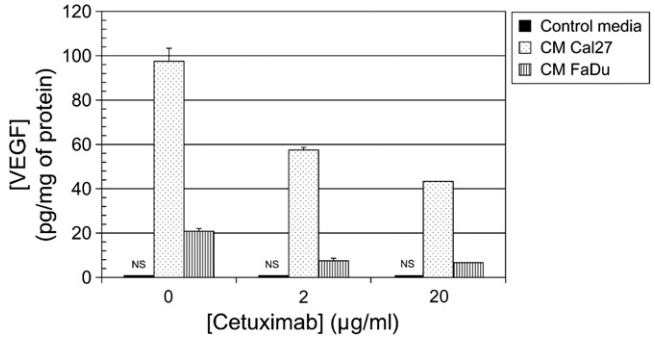


Fig. 3. Effect of cetuximab on the secretion of VEGF by HNSCC cell lines. VEGF secretion was quantified in control media (■), CM Cal27 (□) and CM FaDu (▥) using Bioplex analysis assay.

angiogenic proteins decreased markedly under cetuximab exposure as observed for VEGF-A (−54%), uPA (−42%), IL-8 (−29%), MCP-1 (−39%), MMP-9 (−58%), TF (−63%), CXCL-16 (−34%) and more slightly for ET-1 (−18%). Interestingly, ANG, which was found to be a potent pro-angiogenic protein, increased under cetuximab exposure (+38%).

When FaDu cells were exposed to cetuximab 20 µg/ml (Fig. 4B), the secretion of some pro-angiogenic proteins decreased like IL-8 (−33%), uPA (−25%), VEGF-A (−71%) while another proteins were not modified like MMP-9. The secretion of anti-angiogenic protein PAI-1 and TIMP-1 was decreased (−29% and −25% respectively) whereas PTX-3 was not modified.

Indirect effect of cetuximab on the expression of EGFR, VEGFR-2, PECAM-1 and Notch-4 by endothelial cells

In order to know if cetuximab modifies endothelial cell expression of some membrane bound protein, we chosen to analyze global VEGFR-2, EGFR, PECAM-1 and Notch-4 expression of HUVEC by western blotting.

As expected, EGFR was very slightly expressed on HUVEC when cultured with control media (Fig. 5A). When cultured with CM Cal27, EGFR expression of HUVEC was not modified as compared to control medium but interestingly was increased approx 50% with 20 µg/ml of cetuximab in this conditioned media. In contrary, CM FaDu increased statistically EGFR expression of HUVEC as compared to control medium but 20 µg/ml of cetuximab in this CM decreased this overexpression.

PECAM-1, Notch-4 and VEGFR-2 expression of HUVEC was not modified whatever cetuximab concentration used (Figs. 5B, C and D respectively). We can notice that PECAM-1 expression decreased when HUVEC were cultured in CM Cal27.

Discussion

Cetuximab, a monoclonal antibody directed against EGFR, blocks activation of this receptor and the downstream signaling cascade. The anti-tumor effects of cetuximab are known to be due to an interaction with direct tumor cellular growth and invasion as well as an indirect anti-angiogenic effect (Huang et al., 2002) attributed to the inhibition of VEGF-A, IL-8 and FGF-2 secretion by tumor cells (Perrotte et al., 1999; De Luca et al., 2008; Viloria-Petit et al., 2001). Nevertheless, recent publications reported that, *in vivo*, the vascular normalization observed in gefitinib (Qayum et al., 2009) and erlotinib (Cerniglia et al., 2009) (EGFR-TKI) treated tumors was associated with an enhancement of vessel density and blood flow. The present study was designed to better understand the influence of anti-EGFR therapies on the tumor-endothelial cell communication and is the first to evaluate the behavior of endothelial cells cultured in conditioned media obtained from HNSCC cell lines exposed to cetuximab.

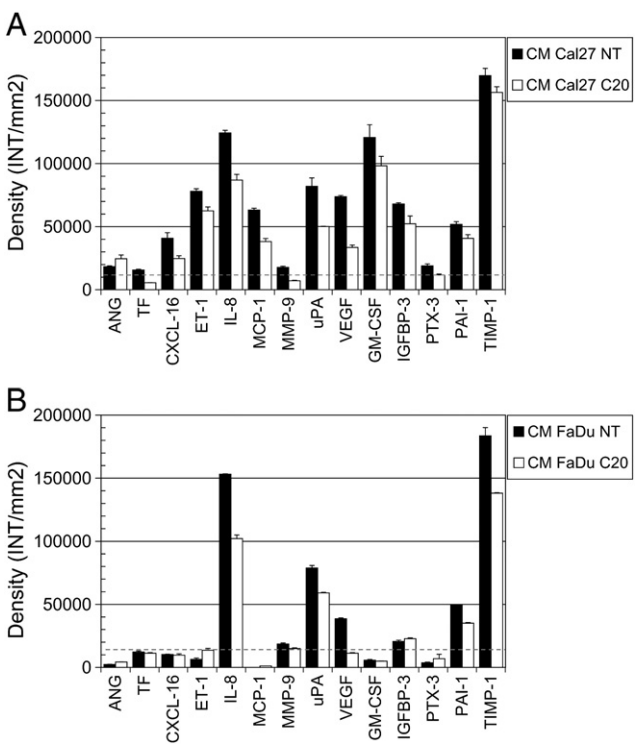


Fig. 4. Effect of cetuximab on angiogenesis related proteins secreted by HNSCC cell lines. Analysis of angiogenesis mediators in CM Cal27 (A) or CM FaDu (B) with 20 µg/ml (or C20) (□) or without cetuximab (or NT) (■). Background noise was subtracted from the experimental values of intensity/mm^2. A signal to background noise ratio is three.

The effect of cetuximab on HNSCC was investigated in FaDu (HTB-43) and Cal27 (CRL-2095). Our results show that cetuximab induced a 20% decrease of mitochondrial dehydrogenase activity of Cal27 (Mriouah et al., 2010) and FaDu and a similar blockage on G0/G1 phase (data not shown). Furthermore, cetuximab induced 20% decrease of the number of Cal27 cells but not of FaDu (data not shown). Accordingly, Cal27 was found to be more sensitive to cetuximab exposure than FaDu (Mriouah et al., 2010). In addition, EGFR expression was found higher in Cal27 compared with FaDu (data not shown) as also reported by Azemar et al. (2000) and the expression of the mutated EGFR was detected only in Cal27 (data not shown).

The difference observed between these two HNSCC cell lines was also found in the level of VEGF-A secretion and the variety of pro and anti-angiogenic mediators detected in array which were found more elevated in Cal27. Despite these differences, CAL27 and Fadu conditioned media induced a similar effect on endothelial cell network formation.

These angiogenic secretions were found to decrease under cetuximab exposure whatever cell line used, as already observed for VEGF-A in UM-SCC-9 and 11B HNSCC cell lines (Bancroft et al., 2002) and show the complexity of tumor angiogenic process. Surprisingly, exposure of HUVEC to conditioned media prepared in presence of cetuximab was found to promote the formation of endothelial cell network and enhanced the number of junction as well as the cell density. It is in agreement with recent pre-clinical studies which demonstrated an increase in tumor vasculature in HNSCC mouse xenografts treated by gefitinib (Qayum et al., 2009) or erlotinib (Cerniglia et al., 2009). In these studies, no consequence on tumor growth rate was observed in the treated tumor probably because the increase in blood supply was countered by the antiproliferative effect of the signaling inhibitor.

The increase in endothelial cell network formation was found to occur in conjunction with a decrease of VEGF-A expression illustrating the complexity of angiogenesis molecular control because tiny variation of the angiogenic balance could be sufficient to modify the behavior of endothelial cells. Moreover, Bates et al. have reported that the

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

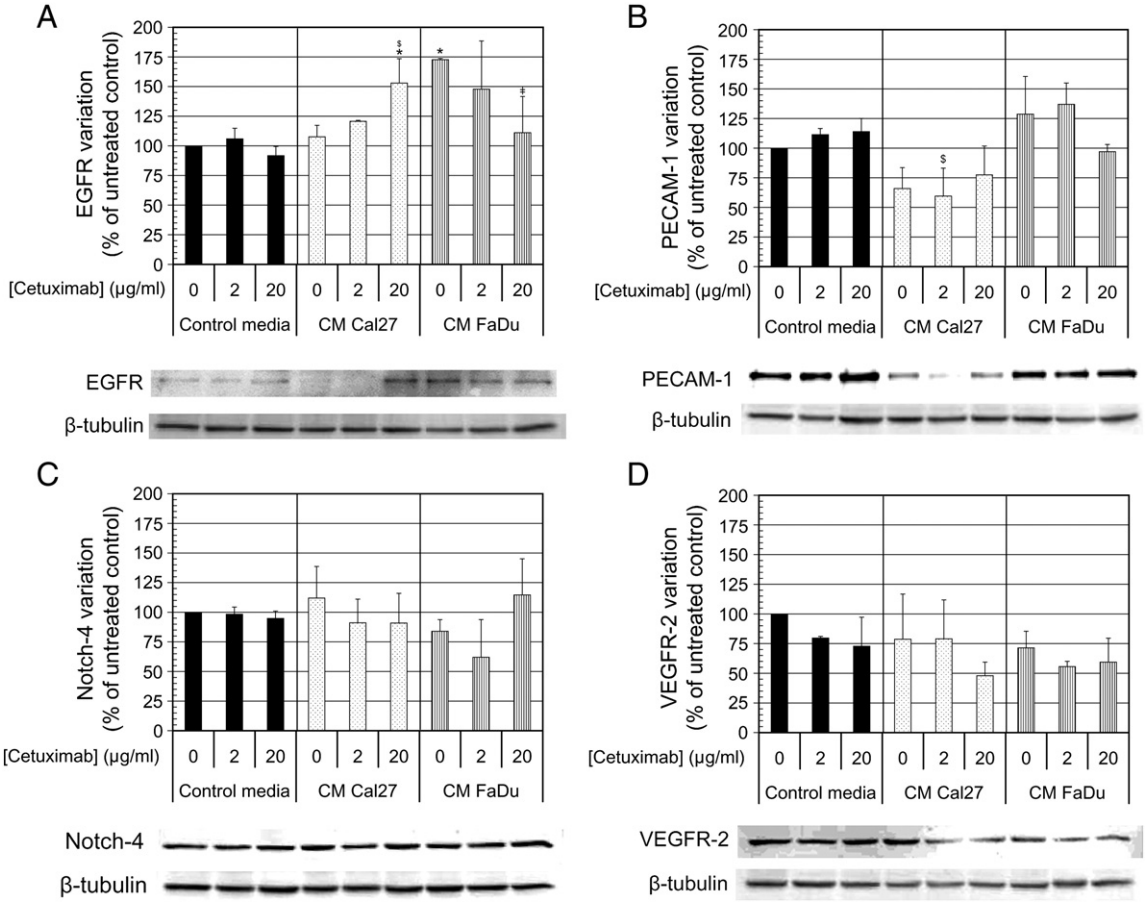


Fig. 5. Effect of conditioned media on total HUVEC membrane expression of EGFR, PECAM-1, VEGFR-2 and Notch-4 (western blotting). Relative expression analysis of western blots of total expression of EGFR (A), PECAM-1 (B), Notch-4 (C) and VEGFR-2 (D) in HUVEC grown in control medium (■), CM Cal27 (□) or CM FaDu (▥) with or without cetuximab (0–20 µg/ml). Results are normalized with β-tubulin values and presented as percent of expression with values obtained with control medium without cetuximab as reference. Differences are considered as significant when $p<0.05$ using PLSD Fisher test. *, versus control medium without cetuximab; $, versus control medium with cetuximab and ‡, versus same group without cetuximab. ($n=3$).

expression of an additional spliced form of VEGF-A called VEGF165b was downregulated in renal cell carcinoma (Bates et al., 2002), prostate cancer (Woolard et al., 2004) or diabetic retinopathy (Perrin et al., 2005). Member of $VEGF_{xxx}b$ isoform family has an anti-angiogenic effect and a decrease of these isoforms could explain the increase of the endothelial cell network formation observed after cetuximab exposure.

Although the expression of EGFR in endothelial cells is debated (Bozec et al., 2005; Amin et al., 2006; Kim et al., 2003; Hirata et al., 2002; Sini et al., 2005; Baker et al., 2002; Semino et al., 2006; Huang et al., 2004), the HUVEC used in the present study were found to slightly express EGFR which was not influenced under cetuximab exposure. Cetuximab (under 25 µg/ml) did not modify endothelial cell viability but induced a moderated decrease of the length and the number of junction of endothelial cell tubes, in agreement with other studies demonstrating that endothelial cells can express EGFR and be responsive to anti-EGFR agents (Bozec et al., 2005; Amin et al., 2006; Hirata et al., 2002; Wu et al., 2007; Kuwai et al., 2008).

In addition, we showed that, in this context, endothelial cells can gain EGFR expression, probably corresponding to the acquisition of tumor phenotype as already reported (Amin et al., 2006). Moreover, Al-Nedawi et al. have showed that endothelial cells can gain information by interaction with microvesicles shed by tumor cells (Al-Nedawi et al., 2009). These microvesicles can bind angiogenic protein and was implicated in several tumor process such as angiogenesis (Muralidharan-Chari et al.). Finally, Taraboletti et al. (2002) have showed that very low concentrations of microvesicles stimulated cord formation and higher ones being inhibitory but are required to increase HUVEC invasiveness. Thus, it is possible that our HNSCC released such microvesicles that can interact with endothelial cells to promote angiogenesis since TMV have been described in PC13 (HNSCC cell line) and in sera of HNSCC patients (Szajnik et al.; Bergmann et al., 2009).

Taken together all these data clearly show that the effect of cetuximab should be mediated by direct effect on EGFR signaling and indirect effect on angiogenesis mediators secreted by tumor cells. The effect of cetuximab on tumor vasculature increases tumor oxygenation and enhances the distribution of cytotoxic agent and could explain the efficacy of cetuximab in clinic in association with chemotherapy and radiotherapy. However, this raises the question of using cetuximab as single agent since increasing the effectiveness of the vasculature could lead to enhanced tumor growth. These results could explain in part the lack of benefit of the association of anti-EGFR monoclonal antibodies with bevacizumab (an anti-VEGF therapy) reported in clinical trials with cetuximab (Tol et al., 2009) and panitunumab (Hecht et al., 2009). Finally, the decrease of pro-angiogenic agent secretion induced by anti-EGFR treatment (such as VEGF-A, IL-8 or FGF-2) should not be sufficient to affirm that this targeted therapy has an anti-angiogenic activity in HNSCC and should be studied specifically to propose more efficient association therapy.

Acknowledgments

The authors are very grateful to the staff of obstetric department of Nancy maternity hospital and pregnant women for providing umbilical cords; Carole Ramacci in Centre Alexis Vautrin for their helpful in Bioplex technical support. This study was supported by

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

ARTICLE IN PRESS

grants from the French 'Ligue Nationale contre le Cancer' and the 'Region Lorraine'.

Conflict of interest

The authors reported no potential conflict of interest.

Author contributions

V. JH and C. B. designed research and performed research; V. JH, C. B and B. F. analyzed data; V. JH, C. B., JL. M. and B. F. wrote paper and B. F. was guarantor of the study.

References

Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R.S., Allison, A.C., Rak, J., 2009. Proc. Natl Acad. Sci. USA 106 (10), 3794–3799.

Amin, D.N., Hida, K., Bielenberg, D.R., Klagsbrun, M., 2006. Cancer Res. 66 (4), 2173–2180.

Ang, K.K., Berkey, B.A., Tu, X., Zhang, H.Z., Katz, R., Hammond, E.H., Fu, K.K., Milas, L., 2002. Cancer Res. 62 (24), 7350–7356.

Azemar, M., Schmidt, M., Arlt, F., Kennel, P., Brandt, B., Papadimitriou, A., Groner, B., Wels, W., 2000. Int. J. Cancer 86 (2), 269–275.

Baker, C.H., Kedar, D., McCarty, M.F., Tsan, R., Weber, K.L., Bucana, C.D., Fidler, I.J., 2002. Am. J. Pathol. 161 (3), 929–938.

Bancroft, C.C., Chen, Z., Yeh, J., Sunwoo, J.B., Yeh, N.T., Jackson, S., Jackson, C., Van Waes, C., 2002. Int. J. Cancer 99 (4), 538–548.

Baselga, J., Eur, J., 2001. Cancer 37 (Suppl 4), S16–S22.

Bates, D.O., Cui, T.G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., Harper, S.J., 2002. Cancer Res. 62 (14), 4123–4131.

Bergmann, C., Strauss, L., Wieckowski, E., Czystowska, M., Albers, A., Wang, Y., Zeidler, R., Lang, S., Whiteside, T.L., 2009. Head Neck 31 (3), 371–380.

Bonner, J.A., Harari, P.M., Giralt, J., Azarnia, N., Shin, D.M., Cohen, R.B., Jones, C.U., Sur, R., Raben, D., Jassem, J., Ove, R., Kies, M.S., Baselga, J., Youssoufian, H., Amellal, N., Rowinsky, E.K., Ang, K.K., 2006. N Engl J. Med. 354 (6), 567–578.

Bozec, A., Formento, P., Ciccolini, J., Fanciullino, R., Padovani, L., Murraciole, X., Fischel, J.L., Milano, G., 2005. Mol. Cancer Ther. 4 (12), 1962–1971.

Casanova, M.L., Larcher, F., Casanova, B., Murillas, R., Fernandez-Acenero, M.J., Villanueva, C., Martinez-Palacio, J., Ullrich, A., Conti, C.J., Jorcano, J.L., 2002. Cancer Res. 62 (12), 3402–3407.

Cerniglia, G.J., Pore, N., Tsai, J.H., Schultz, S., Mick, R., Choe, R., Xing, X., Durduran, T., Yodh, A.G., Evans, S.M., Koch, C.J., Hahn, S.M., Quon, H., Sehgal, C.M., Lee, W.M., Maity, A., 2009. PLoS One 4 (8), e6539.

De Luca, A., Carotenuto, A., Rachiglio, A., Gallo, M., Maiello, M.R., Aldinucci, D., Pinto, A., Normanno, N., 2008. J. Cell. Physiol. 214 (3), 559–567.

Goldman, C.K., Kim, J., Wong, W.L., King, V., Brock, T., Gillespie, G.Y., 1993. Mol. Biol. Cell 4 (1), 121–133.

Hecht, J.R., Mitchell, E., Chidiac, T., Scroggin, C., Hagenstad, C., Spigel, D., Marshall, J., Cohn, A., McCollum, D., Stella, P., Deeter, R., Shahin, S., Amado, R.G., 2009. J. Clin. Oncol. 27 (5), 672–680.

Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M., Ono, M., 2002. Cancer Res. 62 (9), 2554–2560.

Huang, S.M., Li, J., Harari, P.M., 2002. Mol. Cancer Ther. 1 (7), 507–514.

Huang, S., Armstrong, E.A., Benavente, S., Chinnaiyan, P., Harari, P.M., 2004. Cancer Res. 64 (15), 5355–5362.

Jaffe, E.A., Nachman, R.L., Becker, C.G., Minick, C.R., 1973. J. Clin. Investig. 52 (11), 2745–2756.

Jain, R.K., 2001. Nat. Med. 7 (9), 987–989.

Kim, H.S., Shin, H.S., Kwak, H.J., Cho, C.H., Lee, C.O., Koh, G.Y., 2003. FASEB J. 17 (2), 318–320.

Kuwai, T., Nakamura, T., Sasaki, T., Kim, S.J., Fan, D., Villares, G.J., Zigler, M., Wang, H., Bar-Eli, M., Kerbel, R.S., Fidler, I.J., 2008. Neoplasia 10 (5), 489–500.

Mriouah, J., Boura, C., Pinel, S., Chretien, A.S., Fifre, A., Merlin, J.L., Faivre, B., 2010. Int. J. Oncol. 37 (6), 1555–1563.

Muralidharan-Chari, V., Clancy, J.W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C., 2010. J. Cell Sci. 123 (Pt 10), 1603–1611.

Perrin, R.M., Konopatskaya, O., Qiu, Y., Harper, S., Bates, D.O., Churchill, A.J., 2005. Diabetologia 48 (11), 2422–2427.

Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B.Y., Hicklin, D.J., Radinsky, R., Dinney, C.P., 1999. Clin. Cancer Res. 5 (2), 257–265.

Qayum, N., Muschel, R.J., Im, J.H., Balathasan, L., Koch, C.J., Patel, S., McKenna, W.G., Bernhard, E.J., 2009. Cancer Res. 69 (15), 6347–6354.

Repertinger, S.K., Campagnaro, E., Fuhrman, J., El-Abaseri, T., Yuspa, S.H., Hansen, L.A., 2004. J. Investig. Dermatol. 123 (5), 982–989.

Semino, C.E., Kamm, R.D., Lauffenburger, D.A., 2006. Exp. Cell Res. 312 (3), 289–298.

Sini, P., Wyder, L., Schnell, C., O'Reilly, T., Littlewood, A., Brandt, R., Hynes, N.E., Wood, J., 2005. Clin. Cancer Res. 11 (12), 4521–4532.

Stoll, S., Garner, W., Elder, J., 1997. J. Clin. Investig. 100 (5), 1271–1281.

Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, Whiteside TL., 2010 PLoS One;5(7):e11469.

Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., Dolo, V., 2002. Am. J. Pathol. 160 (2), 673–680.

Tol, J., Koopman, M., Cats, A., Rodenburg, C.J., Creemers, G.J., Schrama, J.G., Erdkamp, F.L., Vos, A.H., van Groeningen, C.J., Sinnige, H.A., Richel, D.J., Voest, E.E., Dijkstra, J.R., Vink-Borger, M.E., Antonini, N.F., Mol, L., van Krieken, J.H., Dalesio, O., Punt, C.J., 2009. N Engl J. Med. 360 (6), 563–572.

Viloria-Petit, A., Crombet, T., Jothy, S., Hicklin, D., Bohlen, P., Schlaeppi, J.M., Rak, J., Kerbel, R.S., 2001. Cancer Res. 61 (13), 5090–5101.

Vincenzi, B., Schiavon, G., Silletta, M., Santini, D., Tonini, G., 2008. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 68 (2), 93–106.

Woolard, J., Wang, W.Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J.D., Whittles, C.E., Mushens, R.E., Gillatt, D.A., Ziche, M., Harper, S.J., Bates, D.O., 2004. Cancer Res. 64 (21), 7822–7835.

Wu, W., Onn, A., Isobe, T., Itasaka, S., Langley, R.R., Shitani, T., Shibuya, K., Komaki, R., Ryan, A.J., Fidler, I.J., Herbst, R.S., O'Reilly, M.S., 2007. Mol. Cancer Ther. 6 (2), 471–483.

Zhu, Z., 2007. Acta Pharmacol. Sin. 28 (9), 1476–1493.

Please cite this article as: Jouan-Hureaux, V., et al., Modulation of endothelial cell network formation *in vitro* by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab, Microvasc. Res. (2011), doi:10.1016/j.mvr.2011.07.008

Références bibliographiques

1. Yuan, S. Y., and Rigor, R. R. (2011) Regulation of Endothelial Barrier Function. Chap 2. Structure and function of exchange microvessels. *Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease.*
2. Yuan, S. Y., and Rigor, R. R. (2011) Regulation of Endothelial Barrier Function. Chap 4. The endothelial barrier. *Integrated Systems Physiology: from Molecule to Function to Disease.*
3. Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., and Claesson-Welsh, L. (2011) Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* **437**, 169-183
4. Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J., and Holash, J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248
5. Harper, S. J., and Bates, D. O. (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* **8**, 880-887
6. Guo, S., Liu, M., and Gonzalez-Perez, R. R. (2011) Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* **1815**, 197-213
7. D'Souza, B., Meloty-Kapella, L., and Weinmaster, G. (2010) Canonical and non-canonical Notch ligands. *Curr Top Dev Biol* **92**, 73-129
8. Dumortier, A., Wilson, A., MacDonald, H. R., and Radtke, F. (2005) Paradigms of notch signaling in mammals. *Int J Hematol* **82**, 277-284
9. Siekmann, A. F., Covassin, L., and Lawson, N. D. (2008) Modulation of VEGF signalling output by the Notch pathway. *Bioessays* **30**, 303-313
10. Varon, D., Jackson, D. E., Shenkman, B., Dardik, R., Tamarin, I., Savion, N., and Newman, P. J. (1998) Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 serves as a costimulatory agonist receptor that modulates integrin-dependent adhesion and aggregation of human platelets. *Blood* **91**, 500-507
11. Gu, A., and Shively, J. E. (2011) Angiopoietins-1 and -2 play opposing roles in endothelial sprouting of embryoid bodies in 3D culture and their receptor Tie-2 associates with the cell-cell adhesion molecule PECAM1. *Exp Cell Res* **317**, 2171-2182
12. Biswas, P., Canosa, S., Schoenfeld, J., Schoenfeld, D., Tucker, A., and Madri, J. A. (2003) PECAM-1 promotes beta-catenin accumulation and stimulates endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 212-218
13. Iurlaro, M., Demontis, F., Corada, M., Zanetta, L., Drake, C., Gariboldi, M., Peiro, S., Cano, A., Navarro, P., Cattelino, A., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Dejana, E. (2004) VE-cadherin expression and clustering maintain low levels of survivin in endothelial cells. *Am J Pathol* **165**, 181-189
14. DeLisser, H. M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Robinson, C. S., Wexler, R. S., Kerr, J. S., Garlanda, C., Merwin, J. R., Madri, J. A., and Albelda, S. M. (1997) Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol* **151**, 671-677
15. Yang, S., Graham, J., Kahn, J. W., Schwartz, E. A., and Gerritsen, M. E. (1999) Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* **155**, 887-895
16. Cao, G., O'Brien, C. D., Zhou, Z., Sanders, S. M., Greenbaum, J. N., Makrigiannakis, A., and DeLisser, H. M. (2002) Involvement of human PECAM-1 in angiogenesis and in vitro endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**, C1181-1190
17. Zhou, Z., Christofidou-Solomidou, M., Garlanda, C., and DeLisser, H. M. (1999) Antibody against murine PECAM-1 inhibits tumor angiogenesis in mice. *Angiogenesis* **3**, 181-188

18. Cao, G., Fehrenbach, M. L., Williams, J. T., Finklestein, J. M., Zhu, J. X., and Delisser, H. M. (2009) Angiogenesis in platelet endothelial cell adhesion molecule-1-null mice. *Am J Pathol* **175**, 903-915
19. Woodfin, A., Voisin, M. B., and Nourshargh, S. (2007) PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**, 2514-2523
20. Sheibani, N., Sorenson, C. M., and Frazier, W. A. (1999) Tissue specific expression of alternatively spliced murine PECAM-1 isoforms. *Dev Dyn* **214**, 44-54
21. DiMaio, T. A., and Sheibani, N. (2008) PECAM-1 isoform-specific functions in PECAM-1-deficient brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* **75**, 188-201
22. Kondo, S., Scheef, E. A., Sheibani, N., and Sorenson, C. M. (2007) PECAM-1 isoform-specific regulation of kidney endothelial cell migration and capillary morphogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **292**, C2070-2083
23. Rajesh, M., Kolmakova, A., and Chatterjee, S. (2005) Novel role of lactosylceramide in vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis in human endothelial cells. *Circ Res* **97**, 796-804
24. Wang, Y., Su, X., Wu, Z., and Sheibani, N. (2005) Thrombospondin-1 deficient mice exhibit an altered expression pattern of alternatively spliced PECAM-1 isoforms in retinal vasculature and endothelial cells. *J Cell Physiol* **204**, 352-361
25. Sheibani, N., and Frazier, W. A. (1999) Thrombospondin-1, PECAM-1, and regulation of angiogenesis. *Histol Histopathol* **14**, 285-294
26. Sheibani, N., and Frazier, W. A. (1998) Down-regulation of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 results in thrombospondin-1 expression and concerted regulation of endothelial cell phenotype. *Mol Biol Cell* **9**, 701-713
27. Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., and Dejana, E. (1995) The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol* **129**, 203-217
28. Chen, X., Kojima, S., Borisy, G. G., and Green, K. J. (2003) p120 catenin associates with kinesin and facilitates the transport of cadherin-catenin complexes to intercellular junctions. *J Cell Biol* **163**, 547-557
29. Ligon, L. A., and Holzbaur, E. L. (2007) Microtubules tethered at epithelial cell junctions by dynein facilitate efficient junction assembly. *Traffic* **8**, 808-819
30. Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N., Burstein, D., Doukas, J., Soll, R., Losordo, D., and Cheresh, D. (2004) Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest* **113**, 885-894
31. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994) Part IV. Chapter 19. Cell Junctions, Cell Adhesion, and the Extracellular Matrix. *Molecular Biology of the Cell, 3rd edition*
32. Colorado, P. C., Torre, A., Kamphaus, G., Maeshima, Y., Hopfer, H., Takahashi, K., Volk, R., Zamborsky, E. D., Herman, S., Sarkar, P. K., Ericksen, M. B., Dhanabal, M., Simons, M., Post, M., Kufe, D. W., Weichselbaum, R. R., Sukhatme, V. P., and Kalluri, R. (2000) Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res* **60**, 2520-2526
33. Kamphaus, G. D., Colorado, P. C., Panka, D. J., Hopfer, H., Ramchandran, R., Torre, A., Maeshima, Y., Mier, J. W., Sukhatme, V. P., and Kalluri, R. (2000) Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem* **275**, 1209-1215

34. Maeshima, Y., Colorado, P. C., and Kalluri, R. (2000) Two RGD-independent alpha vbeta 3 integrin binding sites on tumstatin regulate distinct anti-tumor properties. *J Biol Chem* **275**, 23745-23750
35. Kalluri, R. (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **3**, 422-433
36. Darland, D. C., and D'Amore, P. A. (2001) Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* **52**, 107-149
37. Ribatti, D., Nico, B., and Crivellato, E. (2011) The role of pericytes in angiogenesis. *Int J Dev Biol* **55**, 261-268
38. Xu, K., and Cleaver, O. (2011) Tubulogenesis during blood vessel formation. *Semin Cell Dev Biol*
39. Davis, G. E., Black, S. M., and Bayless, K. J. (2000) Capillary morphogenesis during human endothelial cell invasion of three-dimensional collagen matrices. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **36**, 513-519
40. Zovein, A. C., Luque, A., Turlo, K. A., Hofmann, J. J., Yee, K. M., Becker, M. S., Fassler, R., Mellman, I., Lane, T. F., and Iruela-Arispe, M. L. (2010) Beta1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev Cell* **18**, 39-51
41. Leite de Oliveira, R., Hamm, A., and Mazzone, M. (2011) Growing tumor vessels: more than one way to skin a cat - implications for angiogenesis targeted cancer therapies. *Mol Aspects Med* **32**, 71-87
42. Djonov, V. G., Kurz, H., and Burri, P. H. (2002) Optimality in the developing vascular system: branching remodeling by means of intussusception as an efficient adaptation mechanism. *Dev Dyn* **224**, 391-402
43. Kilarski, W. W., and Gerwins, P. (2009) A new mechanism of blood vessel growth - hope for new treatment strategies. *Discov Med* **8**, 23-27
44. Kilarski, W. W., Samolov, B., Petersson, L., Kvanta, A., and Gerwins, P. (2009) Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med* **15**, 657-664
45. Sudhakar, A. (2009) The Matrix Reloaded: New Insights from Type IV Collagen Derived Endogenous Angiogenesis Inhibitors and their Mechanism of Action. *J Bioequiv Availab* **1**, 052-062
46. de Bouard, S., and Guillamo, J. S. (2005) [Angiogenesis and anti-angiogenic strategies for glioblastoma]. *Bull Cancer* **92**, 360-372
47. Distler, J. H., Hirth, A., Kurowska-Stolarska, M., Gay, R. E., Gay, S., and Distler, O. (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* **47**, 149-161
48. Scoazec, J. (2000) [Tumor angiogenesis]. *Ann Pathol* **20**, 25-37
49. Pousa, I. D., and Gisbert, J. P. (2006) Gastric angiogenesis and Helicobacter pylori infection. *Rev Esp Enferm Dig* **98**, 527-541
50. Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2009) Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev Cell* **16**, 167-179
51. Fong, G. H., and Takeda, K. (2008) Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ* **15**, 635-641
52. Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J., and Kim, K. W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell* **111**, 709-720
53. Schofield, C. J., and Ratcliffe, P. J. (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 343-354

54. Mahon, P. C., Hirota, K., and Semenza, G. L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev* **15**, 2675-2686
55. Elkins, J. M., Hewitson, K. S., McNeill, L. A., Seibel, J. F., Schlemminger, I., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Schofield, C. J. (2003) Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J Biol Chem* **278**, 1802-1806
56. Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S., and Simos, G. (2006) Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* **281**, 33095-33106
57. Berta, M. A., Mazure, N., Hattab, M., Pouyssegur, J., and Brahimi-Horn, M. C. (2007) SUMOylation of hypoxia-inducible factor-1alpha reduces its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun* **360**, 646-652
58. Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W., and Li, C. Y. (2007) Regulation of HIF-1alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell* **26**, 63-74
59. Semenza, G. L. (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 167-171
60. Cassavaugh, J., and Lounsbury, K. M. (2011) Hypoxia-mediated biological control. *J Cell Biochem* **112**, 735-744
61. Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L. S., Cox, G. W., and Varesio, L. (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med* **182**, 1683-1693
62. Ben-Yosef, Y., Lahat, N., Shapiro, S., Bitterman, H., and Miller, A. (2002) Regulation of endothelial matrix metalloproteinase-2 by hypoxia/reoxygenation. *Circ Res* **90**, 784-791
63. Kietzmann, T., Roth, U., and Jungermann, K. (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood* **94**, 4177-4185
64. Ke, Q., and Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* **70**, 1469-1480
65. Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G. L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* **59**, 3915-3918
66. Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P., and Semenza, G. L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* **63**, 1138-1143
67. Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., and Goldberg, M. A. (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem* **270**, 13333-13340
68. Brogi, E., Schatteman, G., Wu, T., Kim, E. A., Varticovski, L., Keyt, B., and Isner, J. M. (1996) Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J Clin Invest* **97**, 469-476
69. Bergers, G., and Benjamin, L. E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**, 401-410
70. Alexander, J. S., Jackson, S. A., Chaney, E., Kevil, C. G., and Haselton, F. R. (1998) The role of cadherin endocytosis in endothelial barrier regulation: involvement of protein kinase C and actin-cadherin interactions. *Inflammation* **22**, 419-433

71. Kevil, C. G., Ohno, N., Gute, D. C., Okayama, N., Robinson, S. A., Chaney, E., and Alexander, J. S. (1998) Role of cadherin internalization in hydrogen peroxide-mediated endothelial permeability. *Free Radic Biol Med* **24**, 1015-1022
72. Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernolle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuyse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D., and Dejana, E. (1999) Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* **98**, 147-157
73. Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* **111 (Pt 13)**, 1853-1865
74. Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009) Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 165-177
75. Saharinen, P., Eklund, L., Pulkki, K., Bono, P., and Alitalo, K. (2011) VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends Mol Med* **17**, 347-362
76. Fukuhara, S., Sako, K., Minami, T., Noda, K., Kim, H. Z., Kodama, T., Shibuya, M., Takakura, N., Koh, G. Y., and Mochizuki, N. (2008) Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat Cell Biol* **10**, 513-526
77. Holash, J., Wiegand, S. J., and Yancopoulos, G. D. (1999) New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* **18**, 5356-5362
78. Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D., and Wiegand, S. J. (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**, 1994-1998
79. Greenberg, J. I., Shields, D. J., Barillas, S. G., Acevedo, L. M., Murphy, E., Huang, J., Scheppke, L., Stockmann, C., Johnson, R. S., Angle, N., and Cheresh, D. A. (2008) A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature* **456**, 809-813
80. Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1991) Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 902-906
81. Ferrara, N., Gerber, H. P., and LeCouter, J. (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669-676
82. Visse, R., and Nagase, H. (2003) Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* **92**, 827-839
83. Anand-Apte, B., Bao, L., Smith, R., Iwata, K., Olsen, B. R., Zetter, B., and Apte, S. S. (1996) A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem Cell Biol* **74**, 853-862
84. WuDunn, D. (2001) The effect of mechanical strain on matrix metalloproteinase production by bovine trabecular meshwork cells. *Curr Eye Res* **22**, 394-397
85. Seliktar, D., Nerem, R. M., and Galis, Z. S. (2003) Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs. *Tissue Eng* **9**, 657-666
86. van Hinsbergh, V. W., and Koolwijk, P. (2008) Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res* **78**, 203-212

87. Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2003) Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* **314**, 15-23
88. Carmeliet, P., De Smet, F., Loges, S., and Mazzone, M. (2009) Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 315-326
89. Dejana, E., Tournier-Lasserve, E., and Weinstein, B. M. (2009) The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell* **16**, 209-221
90. Phng, L. K., and Gerhardt, H. (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell* **16**, 196-208
91. Hellstrom, M., Phng, L. K., and Gerhardt, H. (2007) VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* **1**, 133-136
92. Williams, C. K., Li, J. L., Murga, M., Harris, A. L., and Tosato, G. (2006) Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* **107**, 931-939
93. Harrington, L. S., Sainson, R. C., Williams, C. K., Taylor, J. M., Shi, W., Li, J. L., and Harris, A. L. (2008) Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc Res* **75**, 144-154
94. Roca, C., and Adams, R. H. (2007) Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. *Genes Dev* **21**, 2511-2524
95. Pitulescu, M. E., and Adams, R. H. (2010) Eph/ephrin molecules--a hub for signaling and endocytosis. *Genes Dev* **24**, 2480-2492
96. Cheresh, D. A. (1992) Structural and biologic properties of integrin-mediated cell adhesion. *Clin Lab Med* **12**, 217-236
97. Stupack, D. G., and Cheresh, D. A. (2004) Integrins and angiogenesis. *Curr Top Dev Biol* **64**, 207-238
98. Wallez, Y., Vilgrain, I., and Huber, P. (2006) Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 55-59
99. Wheelock, M. J., and Johnson, K. R. (2003) Cadherin-mediated cellular signaling. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 509-514
100. Ridley, A. J., and Hall, A. (1992) Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **57**, 661-671
101. Ehrlich, J. S., Hansen, M. D., and Nelson, W. J. (2002) Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259-270
102. Liu, Z. J., Xiao, M., Balint, K., Soma, A., Pinnix, C. C., Capobianco, A. J., Velazquez, O. C., and Herlyn, M. (2006) Inhibition of endothelial cell proliferation by Notch1 signaling is mediated by repressing MAPK and PI3K/Akt pathways and requires MAML1. *FASEB J* **20**, 1009-1011
103. Yana, I., Sagara, H., Takaki, S., Takatsu, K., Nakamura, K., Nakao, K., Katsuki, M., Taniguchi, S., Aoki, T., Sato, H., Weiss, S. J., and Seiki, M. (2007) Crosstalk between neovessels and mural cells directs the site-specific expression of MT1-MMP to endothelial tip cells. *J Cell Sci* **120**, 1607-1614
104. Jain, R. K. (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* **9**, 685-693
105. Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307
106. Hofer, E., and Schweighofer, B. (2007) Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb Haemost* **97**, 355-363

107. Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004) Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* **84**, 869-901
108. London, N. R., Whitehead, K. J., and Li, D. Y. (2009) Endogenous endothelial cell signaling systems maintain vascular stability. *Angiogenesis* **12**, 149-158
109. Lucitti, J. L., Jones, E. A., Huang, C., Chen, J., Fraser, S. E., and Dickinson, M. E. (2007) Vascular remodeling of the mouse yolk sac requires hemodynamic force. *Development* **134**, 3317-3326
110. Baffert, F., Le, T., Sennino, B., Thurston, G., Kuo, C. J., Hu-Lowe, D., and McDonald, D. M. (2006) Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**, H547-559
111. Hughes, S., and Chang-Ling, T. (2000) Roles of endothelial cell migration and apoptosis in vascular remodeling during development of the central nervous system. *Microcirculation* **7**, 317-333
112. Ridgway, J., Zhang, G., Wu, Y., Stawicki, S., Liang, W. C., Chanthery, Y., Kowalski, J., Watts, R. J., Callahan, C., Kasman, I., Singh, M., Chien, M., Tan, C., Hongo, J. A., de Sauvage, F., Plowman, G., and Yan, M. (2006) Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature* **444**, 1083-1087
113. Blum, Y., Belting, H. G., Ellertsdottir, E., Herwig, L., Luders, F., and Affolter, M. (2008) Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo. *Dev Biol* **316**, 312-322
114. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674
115. Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., and Parkin, D. M. (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*
116. Ragin, C. C., Modugno, F., and Gollin, S. M. (2007) The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. *J Dent Res* **86**, 104-114
117. Liebertz, D. J., Lechner, M. G., Masood, R., Sinha, U. K., Han, J., Puri, R. K., Correa, A. J., and Epstein, A. L. (2010) Establishment and characterization of a novel head and neck squamous cell carcinoma cell line USC-HN1. *Head Neck Oncol* **2**, 5
118. Fayette, J., and Kiakouama, L. (2009) [Chemoprevention in head and neck cancer and lung cancer]. *Bull Cancer* **96 Suppl 1**, S25-34
119. Oliveira, L. R., and Ribeiro-Silva, A. (2011) Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **40**, 298-307
120. Hynes, N. E., and Lane, H. A. (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**, 341-354
121. Goldman, C. K., Kim, J., Wong, W. L., King, V., Brock, T., and Gillespie, G. Y. (1993) Epidermal growth factor stimulates vascular endothelial growth factor production by human malignant glioma cells: a model of glioblastoma multiforme pathophysiology. *Mol Biol Cell* **4**, 121-133
122. Casanova, M. L., Larcher, F., Casanova, B., Murillas, R., Fernandez-Acenero, M. J., Villanueva, C., Martinez-Palacio, J., Ullrich, A., Conti, C. J., and Jorcano, J. L. (2002) A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res* **62**, 3402-3407
123. Repertinger, S. K., Campagnaro, E., Fuhrman, J., El-Abaseri, T., Yuspa, S. H., and Hansen, L. A. (2004) EGFR enhances early healing after cutaneous incisional wounding. *J Invest Dermatol* **123**, 982-989

124. Perrotte, P., Matsumoto, T., Inoue, K., Kuniyasu, H., Eve, B. Y., Hicklin, D. J., Radinsky, R., and Dinney, C. P. (1999) Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* **5**, 257-265
125. Bruns, C. J., Solorzano, C. C., Harbison, M. T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R., and Fidler, I. J. (2000) Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma. *Cancer Res* **60**, 2926-2935
126. Ang, K. K., Berkey, B. A., Tu, X., Zhang, H. Z., Katz, R., Hammond, E. H., Fu, K. K., and Milas, L. (2002) Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res* **62**, 7350-7356
127. Huang, S. M., Li, J., and Harari, P. M. (2002) Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther* **1**, 507-514
128. Jain, R. K. (2001) Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* **7**, 987-989
129. Bozec, A., Formento, P., Ciccolini, J., Fanciullino, R., Padovani, L., Murraciole, X., Fischel, J. L., and Milano, G. (2005) Response of endothelial cells to a dual tyrosine kinase receptor inhibition combined with irradiation. *Mol Cancer Ther* **4**, 1962-1971
130. Amin, D. N., Hida, K., Bielenberg, D. R., and Klagsbrun, M. (2006) Tumor endothelial cells express epidermal growth factor receptor (EGFR) but not ErbB3 and are responsive to EGF and to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Res* **66**, 2173-2180
131. Allison, M. (2010) Turning the tide in lung cancer. *Nat Biotechnol* **28**, 999-1002
132. Sorkin, A., and Goh, L. K. (2009) Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs. *Exp Cell Res* **315**, 683-696
133. Mroczkowski, B., Mosig, G., and Cohen, S. (1984) ATP-stimulated interaction between epidermal growth factor receptor and supercoiled DNA. *Nature* **309**, 270-273
134. Lin, S. Y., Makino, K., Xia, W., Matin, A., Wen, Y., Kwong, K. Y., Bourguignon, L., and Hung, M. C. (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* **3**, 802-808
135. Lo, H. W., Xia, W., Wei, Y., Ali-Seyed, M., Huang, S. F., and Hung, M. C. (2005) Novel prognostic value of nuclear epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Cancer Res* **65**, 338-348
136. De Angelis Campos, A. C., Rodrigues, M. A., de Andrade, C., de Goes, A. M., Nathanson, M. H., and Gomes, D. A. Epidermal growth factor receptors destined for the nucleus are internalized via a clathrin-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 341-346
137. Wojtukiewicz, M. Z., Zacharski, L. R., Rucinska, M., Zimnoch, L., Jaromin, J., Rozanska-Kudelska, M., Kisiel, W., and Kudryk, B. J. (1999) Expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in situ in laryngeal carcinoma. *Thromb Haemost* **82**, 1659-1662
138. Ribeiro, F. S., Simao, T. A., Amoedo, N. D., Andreollo, N. A., Lopes, L. R., Acatauassu, R., Rumjanek, F. D., Albano, R. M., Pinto, L. F., and Monteiro, R. Q. (2009) Evidence for increased expression of tissue factor and protease-activated receptor-1 in human esophageal cancer. *Oncol Rep* **21**, 1599-1604
139. Rak, J., Milsom, C., May, L., Klement, P., and Yu, J. (2006) Tissue factor in cancer and angiogenesis: the molecular link between genetic tumor progression, tumor neovascularization, and cancer coagulopathy. *Semin Thromb Hemost* **32**, 54-70

140. Bromberg, M. E., Sundaram, R., Homer, R. J., Garen, A., and Konigsberg, W. H. (1999) Role of tissue factor in metastasis: functions of the cytoplasmic and extracellular domains of the molecule. *Thromb Haemost* **82**, 88-92
141. Castellana, D., Kunzelmann, C., and Freyssinet, J. M. (2009) Pathophysiologic significance of procoagulant microvesicles in cancer disease and progression. *Hamostaseologie* **29**, 51-57
142. Carmeliet, P., Mackman, N., Moons, L., Luther, T., Gressens, P., Van Vlaenderen, I., Demunck, H., Kasper, M., Breier, G., Evrard, P., Muller, M., Risau, W., Edgington, T., and Collen, D. (1996) Role of tissue factor in embryonic blood vessel development. *Nature* **383**, 73-75
143. Zhang, Y., Deng, Y., Luther, T., Muller, M., Ziegler, R., Waldherr, R., Stern, D. M., and Nawroth, P. P. (1994) Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice. *J Clin Invest* **94**, 1320-1327
144. Abe, K., Shoji, M., Chen, J., Bierhaus, A., Danave, I., Micko, C., Casper, K., Dillehay, D. L., Nawroth, P. P., and Rickles, F. R. (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor production and angiogenesis by the cytoplasmic tail of tissue factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8663-8668
145. Lopez-Pedrera, C., Barbarroja, N., Dorado, G., Siendones, E., and Velasco, F. (2006) Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies. *Leukemia* **20**, 1331-1340
146. Zioncheck, T. F., Roy, S., and Vehar, G. A. (1992) The cytoplasmic domain of tissue factor is phosphorylated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Biol Chem* **267**, 3561-3564
147. Ott, I., Fischer, E. G., Miyagi, Y., Mueller, B. M., and Ruf, W. (1998) A role for tissue factor in cell adhesion and migration mediated by interaction with actin-binding protein 280. *J Cell Biol* **140**, 1241-1253
148. Dvorak, H. F., Van DeWater, L., Bitzer, A. M., Dvorak, A. M., Anderson, D., Harvey, V. S., Bach, R., Davis, G. L., DeWolf, W., and Carvalho, A. C. (1983) Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. *Cancer Res* **43**, 4434-4442
149. Bogdanov, V. Y., Balasubramanian, V., Hathcock, J., Vele, O., Lieb, M., and Nemerson, Y. (2003) Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* **9**, 458-462
150. Mackman, N. (2007) Alternatively spliced tissue factor - one cut too many? *Thromb Haemost* **97**, 5-8
151. Jain, R. K. (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58-62
152. McDonald, D. M., and Choyke, P. L. (2003) Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* **9**, 713-725
153. McDonald, D. M., and Baluk, P. (2005) Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* **128**, 602S-608S
154. Chung, A. S., Lee, J., and Ferrara, N. (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **10**, 505-514
155. Jekunen, A., and Kairemo, K. (2003) Inhibition of angiogenesis at endothelial cell level. *Microsc Res Tech* **60**, 85-97
156. Scappaticci, F. A. (2002) Mechanisms and future directions for angiogenesis-based cancer therapies. *J Clin Oncol* **20**, 3906-3927
157. Drake, C. J. (2003) Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**, 73-82

158. Koizumi, K., Tsutsumi, Y., Kamada, H., Yoshioka, Y., Watanabe, M., Yamamoto, Y., Okamoto, T., Mukai, Y., Nakagawa, S., Tani, Y., and Mayumi, T. (2003) Incorporation of adult organ-derived endothelial cells into tumor blood vessel. *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 219-224
159. Beerepoot, L. V., Mehra, N., Vermaat, J. S., Zonnenberg, B. A., Gebbink, M. F., and Voest, E. E. (2004) Increased levels of viable circulating endothelial cells are an indicator of progressive disease in cancer patients. *Ann Oncol* **15**, 139-145
160. Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., and Heissig, B. (2002) Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* **2**, 826-835
161. Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L., and Bedi, A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev* **14**, 34-44
162. Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B., Stokoe, D., and Giaccia, A. J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev* **14**, 391-396
163. Jiang, B. H., Agani, F., Passaniti, A., and Semenza, G. L. (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res* **57**, 5328-5335
164. Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., and Semenza, G. L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* **21**, 3995-4004
165. Semenza, G. L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **3**, 721-732
166. Folkman, J. (2003) Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr Mol Med* **3**, 643-651
167. Rak, J., and Yu, J. L. (2004) Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". *Semin Cancer Biol* **14**, 93-104
168. Orimo, A., Gupta, P. B., Sgroi, D. C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V. J., Richardson, A. L., and Weinberg, R. A. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-348
169. Crawford, Y., Kasman, I., Yu, L., Zhong, C., Wu, X., Modrusan, Z., Kaminker, J., and Ferrara, N. (2009) PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell* **15**, 21-34
170. Dong, J., Grunstein, J., Tejada, M., Peale, F., Frantz, G., Liang, W. C., Bai, W., Yu, L., Kowalski, J., Liang, X., Fuh, G., Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2004) VEGF-null cells require PDGFR alpha signaling-mediated stromal fibroblast recruitment for tumorigenesis. *EMBO J* **23**, 2800-2810
171. Tejada, M. L., Yu, L., Dong, J., Jung, K., Meng, G., Peale, F. V., Frantz, G. D., Hall, L., Liang, X., Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2006) Tumor-driven paracrine platelet-derived growth factor receptor alpha signaling is a key determinant of stromal cell recruitment in a model of human lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 2676-2688
172. Anderberg, C., Li, H., Fredriksson, L., Andrae, J., Betsholtz, C., Li, X., Eriksson, U., and Pietras, K. (2009) Paracrine signaling by platelet-derived growth factor-CC

promotes tumor growth by recruitment of cancer-associated fibroblasts. *Cancer Res* **69**, 369-378

173. Lokker, N. A., Sullivan, C. M., Hollenbach, S. J., Israel, M. A., and Giese, N. A. (2002) Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* **62**, 3729-3735
174. di Tomaso, E., London, N., Fuja, D., Logie, J., Tyrrell, J. A., Kamoun, W., Munn, L. L., and Jain, R. K. (2009) PDGF-C induces maturation of blood vessels in a model of glioblastoma and attenuates the response to anti-VEGF treatment. *PLoS One* **4**, e5123
175. Pollard, J. W. (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* **9**, 259-270
176. Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., Hallett, M., and Park, M. (2008) Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* **14**, 518-527
177. Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C. E. (2004) Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224-2234
178. Bingle, L., Brown, N. J., and Lewis, C. E. (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol* **196**, 254-265
179. Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S. B., and Lewis, C. E. (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* **8**, 618-631
180. Crivellato, E., Nico, B., and Ribatti, D. (2008) Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis. *Cancer Lett* **269**, 1-6
181. Shchors, K., and Evan, G. (2007) Tumor angiogenesis: cause or consequence of cancer? *Cancer Res* **67**, 7059-7061
182. Almand, B., Clark, J. I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N. R., Knight, S. C., Carbone, D. P., and Gabrilovich, D. I. (2001) Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678-689
183. Diaz-Montero, C. M., Salem, M. L., Nishimura, M. I., Garrett-Mayer, E., Cole, D. J., and Montero, A. J. (2009) Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 49-59
184. Gabrilovich, D. I., and Nagaraj, S. (2009) Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* **9**, 162-174
185. Shojaei, F., Wu, X., Malik, A. K., Zhong, C., Baldwin, M. E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H. P., and Ferrara, N. (2007) Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol* **25**, 911-920
186. LeCouter, J., Lin, R., Tejada, M., Frantz, G., Peale, F., Hillan, K. J., and Ferrara, N. (2003) The endocrine-gland-derived VEGF homologue Bv8 promotes angiogenesis in the testis: Localization of Bv8 receptors to endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2685-2690
187. LeCouter, J., Zlot, C., Tejada, M., Peale, F., and Ferrara, N. (2004) Bv8 and endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor stimulate hematopoiesis and hematopoietic cell mobilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16813-16818
188. Shojaei, F., Wu, X., Qu, X., Kowanetz, M., Yu, L., Tan, M., Meng, Y. G., and Ferrara, N. (2009) G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor

refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6742-6747

189. Munagala, R., Aqil, F., and Gupta, R. C. (2011) Promising molecular targeted therapies in breast cancer. *Indian J Pharmacol* **43**, 236-245
190. Kerbel, R., and Folkman, J. (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* **2**, 727-739
191. Bhadada, S. V., Goyal, B. R., and Patel, M. M. (2011) Angiogenic targets for potential disorders. *Fundam Clin Pharmacol* **25**, 29-47
192. Roskoski, R., Jr. (2008) VEGF receptor protein-tyrosine kinases: structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **375**, 287-291
193. Morel, O., Morel, N., Hugel, B., Jesel, L., Vinzio, S., Goichot, B., Bakouboula, B., Grunebaum, L., Freyssinet, J. M., and Toti, F. (2005) [The significance of circulating microparticles in physiology, inflammatory and thrombotic diseases]. *Rev Med Interne* **26**, 791-801
194. Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., and Dolo, V. (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* **160**, 673-680
195. Leroyer, A. S., Lacroix, R., and Dignat-George, F. (2011) Microparticules et cancers. *VEGF Actu* **23**, 7-9
196. Del Conde, I., Shrimpton, C. N., Thiagarajan, P., and Lopez, J. A. (2005) Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**, 1604-1611
197. Lee, T. H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., and Rak, J. (2011) Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'. *Semin Immunopathol*
198. Dolo, V., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Millimaggi, D., Taraboletti, G., and Pavan, A. (2005) Shedding of membrane vesicles by tumor and endothelial cells. *Ital J Anat Embryol* **110**, 127-133
199. Yu, J. L., May, L., Lhotak, V., Shahrzad, S., Shirasawa, S., Weitz, J. I., Coomber, B. L., Mackman, N., and Rak, J. W. (2005) Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* **105**, 1734-1741
200. Baj-Krzyworzeka, M., Szatanek, R., Weglarczyk, K., Baran, J., Urbanowicz, B., Branski, P., Ratajczak, M. Z., and Zembala, M. (2006) Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 808-818
201. Dolo, V., Adobati, E., Canevari, S., Picone, M. A., and Vittorelli, M. L. (1995) Membrane vesicles shed into the extracellular medium by human breast carcinoma cells carry tumor-associated surface antigens. *Clin Exp Metastasis* **13**, 277-286
202. Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., and Varner, J. A. (2000) Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin alpha5beta1 with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am J Pathol* **156**, 1345-1362
203. Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-Valdre, E., Nakamura, H., Ilmonen, M., Lombardo, C., Pihlajaniemi, T., Alitalo, K., and Vuori, K. (2001) Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1024-1029
204. Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G., and Rivoltini, L. (2006) Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res* **66**, 9290-9298

205. Dolo, V., Ginestra, A., Ghersi, G., Nagase, H., and Vittorelli, M. L. (1994) Human breast carcinoma cells cultured in the presence of serum shed membrane vesicles rich in gelatinolytic activities. *J Submicrosc Cytol Pathol* **26**, 173-180
206. van Doormaal, F. F., Kleinjan, A., Di Nisio, M., Buller, H. R., and Nieuwland, R. (2009) Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med* **67**, 266-273
207. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., and Rak, J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10**, 619-624
208. Cocucci, E., Racchetti, G., and Meldolesi, J. (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* **19**, 43-51
209. Piccin, A., Murphy, W. G., and Smith, O. P. (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* **21**, 157-171
210. McLaughlin, P. J., Gooch, J. T., Mannherz, H. G., and Weeds, A. G. (1993) Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* **364**, 685-692
211. Nambiar, R., McConnell, R. E., and Tyska, M. J. (2009) Control of cell membrane tension by myosin-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 11972-11977
212. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C. (2009) ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* **19**, 1875-1885
213. Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., and D'Souza-Schorey, C. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci* **123**, 1603-1611
214. Pilzer, D., Gasser, O., Moskovich, O., Schifferli, J. A., and Fishelson, Z. (2005) Emission of membrane vesicles: roles in complement resistance, immunity and cancer. *Springer Semin Immunopathol* **27**, 375-387
215. Bergmann, C., Strauss, L., Wieckowski, E., Czystowska, M., Albers, A., Wang, Y., Zeidler, R., Lang, S., and Whiteside, T. L. (2009) Tumor-derived microvesicles in sera of patients with head and neck cancer and their role in tumor progression. *Head Neck* **31**, 371-380
216. Whitlow, M. B., and Klein, L. M. (1997) Response of SCC-12F, a human squamous cell carcinoma cell line, to complement attack. *J Invest Dermatol* **109**, 39-45
217. Al-Nedawi, K., Meehan, B., Kerbel, R. S., Allison, A. C., and Rak, J. (2009) Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3794-3799
218. Shedden, K., Xie, X. T., Chandaroy, P., Chang, Y. T., and Rosania, G. R. (2003) Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles. *Cancer Res* **63**, 4331-4337
219. Safaei, R., Katano, K., Larson, B. J., Samimi, G., Holzer, A. K., Naerdemann, W., Tomioka, M., Goodman, M., and Howell, S. B. (2005) Intracellular localization and trafficking of fluorescein-labeled cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Clin Cancer Res* **11**, 756-767
220. Albanese, J., Meterissian, S., Kontogiannea, M., Dubreuil, C., Hand, A., Sorba, S., and Dainiak, N. (1998) Biologically active Fas antigen and its cognate ligand are expressed on plasma membrane-derived extracellular vesicles. *Blood* **91**, 3862-3874
221. Kim, J. W., Wieckowski, E., Taylor, D. D., Reichert, T. E., Watkins, S., and Whiteside, T. L. (2005) Fas ligand-positive membranous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* **11**, 1010-1020

222. Schroit, A. J., Tanaka, Y., Madsen, J., and Fidler, I. J. (1984) The recognition of red blood cells by macrophages: role of phosphatidylserine and possible implications of membrane phospholipid asymmetry. *Biol Cell* **51**, 227-238
223. Johnstone, R. M. (2006) Exosomes biological significance: A concise review. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 315-321
224. Sims, P. J., Faioni, E. M., Wiedmer, T., and Shattil, S. J. (1988) Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* **263**, 18205-18212
225. Carney, D. F., Hammer, C. H., and Shin, M. L. (1986) Elimination of terminal complement complexes in the plasma membrane of nucleated cells: influence of extracellular Ca2+ and association with cellular Ca2+. *J Immunol* **137**, 263-270
226. Ginestra, A., La Placa, M. D., Saladino, F., Cassara, D., Nagase, H., and Vittorelli, M. L. (1998) The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res* **18**, 3433-3437
227. Ginestra, A., Miceli, D., Dolo, V., Romano, F. M., and Vittorelli, M. L. (1999) Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res* **19**, 3439-3445
228. Castellana, D., Zobairi, F., Martinez, M. C., Panaro, M. A., Mitolo, V., Freyssinet, J. M., and Kunzelmann, C. (2009) Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res* **69**, 785-793
229. Wysoczynski, M., and Ratajczak, M. Z. (2009) Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer* **125**, 1595-1603
230. Rauch, U., Bonderman, D., Bohrmann, B., Badimon, J. J., Himber, J., Riederer, M. A., and Nemerson, Y. (2000) Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* **96**, 170-175
231. Pap, E., Pallinger, E., Pasztoi, M., and Falus, A. (2009) Highlights of a new type of intercellular communication: microvesicle-based information transfer. *Inflamm Res* **58**, 1-8
232. Skog, J., Wurdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W. T., Jr., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., and Breakefield, X. O. (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **10**, 1470-1476
233. Dolo, V., D'Ascenzo, S., Violini, S., Pompucci, L., Festuccia, C., Ginestra, A., Vittorelli, M. L., Canevari, S., and Pavan, A. (1999) Matrix-degrading proteinases are shed in membrane vesicles by ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clin Exp Metastasis* **17**, 131-140
234. Ginestra, A., Monea, S., Seghezzi, G., Dolo, V., Nagase, H., Mignatti, P., and Vittorelli, M. L. (1997) Urokinase plasminogen activator and gelatinases are associated with membrane vesicles shed by human HT1080 fibrosarcoma cells. *J Biol Chem* **272**, 17216-17222
235. Graves, L. E., Ariztia, E. V., Navari, J. R., Matzel, H. J., Stack, M. S., and Fishman, D. A. (2004) Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* **64**, 7045-7049
236. Dolo, V., Ginestra, A., Cassara, D., Violini, S., Lucania, G., Torrisi, M. R., Nagase, H., Canevari, S., Pavan, A., and Vittorelli, M. L. (1998) Selective localization of matrix metalloproteinase 9, beta1 integrins, and human lymphocyte antigen class I

molecules on membrane vesicles shed by 8701-BC breast carcinoma cells. *Cancer Res* **58**, 4468-4474

237. Millimaggi, D., Mari, M., D'Ascenzo, S., Carosa, E., Jannini, E. A., Zucker, S., Carta, G., Pavan, A., and Dolo, V. (2007) Tumor vesicle-associated CD147 modulates the angiogenic capability of endothelial cells. *Neoplasia* **9**, 349-357
238. Janowska-Wieczorek, A., Wysoczynski, M., Kijowski, J., Marquez-Curtis, L., Machalinski, B., Ratajczak, J., and Ratajczak, M. Z. (2005) Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* **113**, 752-760
239. Bluff, J. E., Brown, N. J., Reed, M. W., and Staton, C. A. (2008) Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Res* **10**, 204
240. Kim, C. W., Lee, H. M., Lee, T. H., Kang, C., Kleinman, H. K., and Gho, Y. S. (2002) Extracellular membrane vesicles from tumor cells promote angiogenesis via sphingomyelin. *Cancer Res* **62**, 6312-6317
241. Aharon, A., and Brenner, B. (2009) Microparticles, thrombosis and cancer. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 61-69
242. Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., and Minick, C. R. (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**, 2745-2756
243. Chergui, F., Chretien, A. S., Bouali, S., Ramacci, C., Rouyer, M., Bastogne, T., Genin, P., Leroux, A., and Merlin, J. L. (2009) Validation of a phosphoprotein array assay for characterization of human tyrosine kinase receptor downstream signaling in breast cancer. *Clin Chem* **55**, 1327-1336
244. Lacroix, R., Robert, S., Poncelet, P., Kasthuri, R. S., Key, N. S., and Dignat-George, F. (2010) Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost* **8**, 2571-2574
245. Lecompte, T., Wahl, D., and Regnault, V. (2006) Thrombinographie. *Hématologie* **12**, 115-127
246. Hemker, H. C., Giesen, P., Al Dieri, R., Regnault, V., de Smedt, E., Wagenvoord, R., Lecompte, T., and Beguin, S. (2003) Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb* **33**, 4-15
247. Choueiri, T. K., Schutz, F. A., Je, Y., Rosenberg, J. E., and Bellmunt, J. (2010) Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *J Clin Oncol* **28**, 2280-2285
248. Plastaras, J. P., Kim, S. H., Liu, Y. Y., Dicker, D. T., Dorsey, J. F., McDonough, J., Cerniglia, G., Rajendran, R. R., Gupta, A., Rustgi, A. K., Diehl, J. A., Smith, C. D., Flaherty, K. T., and El-Deiry, W. S. (2007) Cell cycle dependent and schedule-dependent antitumor effects of sorafenib combined with radiation. *Cancer Res* **67**, 9443-9454
249. Tian, S., Quan, H., Xie, C., Guo, H., Lu, F., Xu, Y., Li, J., and Lou, L. (2011) YN968D1 is a novel and selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase with potent activity in vitro and in vivo. *Cancer Sci* **102**, 1374-1380
250. Traxler, P., Allegrini, P. R., Brandt, R., Brueggen, J., Cozens, R., Fabbro, D., Grosios, K., Lane, H. A., McSheehy, P., Mestan, J., Meyer, T., Tang, C., Wartmann, M., Wood, J., and Caravatti, G. (2004) AEE788: a dual family epidermal growth factor receptor/ErbB2 and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* **64**, 4931-4941

251. Deshpande, H., Roman, S., Thumar, J., and Sosa, J. A. (2011) Vandetanib (ZD6474) in the Treatment of Medullary Thyroid Cancer. *Clin Med Insights Oncol* **5**, 213-221
252. Kiselyov, A., Balakin, K. V., and Tkachenko, S. E. (2007) VEGF/VEGFR signalling as a target for inhibiting angiogenesis. *Expert Opin Investig Drugs* **16**, 83-107
253. Huang, D., Ding, Y., Li, Y., Luo, W. M., Zhang, Z. F., Snider, J., Vandenbeldt, K., Qian, C. N., and Teh, B. T. (2010) Sunitinib acts primarily on tumor endothelium rather than tumor cells to inhibit the growth of renal cell carcinoma. *Cancer Res* **70**, 1053-1062
254. Polverino, A., Coxon, A., Starnes, C., Diaz, Z., DeMelfi, T., Wang, L., Bready, J., Estrada, J., Cattley, R., Kaufman, S., Chen, D., Gan, Y., Kumar, G., Meyer, J., Neervannan, S., Alva, G., Talvenheimo, J., Montestruque, S., Tasker, A., Patel, V., Radinsky, R., and Kendall, R. (2006) AMG 706, an oral, multikinase inhibitor that selectively targets vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and kit receptors, potently inhibits angiogenesis and induces regression in tumor xenografts. *Cancer Res* **66**, 8715-8721
255. Hilberg, F., Roth, G. J., Krssak, M., Kautschitsch, S., Sommergruber, W., Tontsch-Grunt, U., Garin-Chesa, P., Bader, G., Zoephel, A., Quant, J., Heckel, A., and Rettig, W. J. (2008) BIBF 1120: triple angiokinase inhibitor with sustained receptor blockade and good antitumor efficacy. *Cancer Res* **68**, 4774-4782
256. Wedge, S. R., Kendrew, J., Hennequin, L. F., Valentine, P. J., Barry, S. T., Brave, S. R., Smith, N. R., James, N. H., Dukes, M., Curwen, J. O., Chester, R., Jackson, J. A., Boffey, S. J., Kilburn, L. L., Barnett, S., Richmond, G. H., Wadsworth, P. F., Walker, M., Bigley, A. L., Taylor, S. T., Cooper, L., Beck, S., Jurgensmeier, J. M., and Ogilvie, D. J. (2005) AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res* **65**, 4389-4400
257. Yamamoto, Y., Watanabe, T., and Tsuruoka, A. (2006) E7080, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, has direct anti-tumor efficacity via inhibition of KIT signaling in gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Proc Am Assoc Cancer Res* **47**, 4038
258. Nakamura, K., Taguchi, E., Miura, T., Yamamoto, A., Takahashi, K., Bichat, F., Guilbaud, N., Hasegawa, K., Kubo, K., Fujiwara, Y., Suzuki, R., Shibuya, M., and Isae, T. (2006) KRN951, a highly potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, has antitumor activities and affects functional vascular properties. *Cancer Res* **66**, 9134-9142
259. Taraboletti, G., and Giavazzi, R. (2004) Modelling approaches for angiogenesis. *Eur J Cancer* **40**, 881-889
260. Bancroft, C. C., Chen, Z., Yeh, J., Sunwoo, J. B., Yeh, N. T., Jackson, S., Jackson, C., and Van Waes, C. (2002) Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, PI3K and MEK signal kinases on NF-kappaB and AP-1 activation and IL-8 and VEGF expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. *Int J Cancer* **99**, 538-548
261. De Luca, A., Carotenuto, A., Rachiglio, A., Gallo, M., Maiello, M. R., Aldinucci, D., Pinto, A., and Normanno, N. (2008) The role of the EGFR signaling in tumor microenvironment. *J Cell Physiol* **214**, 559-567
262. Viloria-Petit, A., Crombet, T., Jothy, S., Hicklin, D., Bohlen, P., Schlaeppi, J. M., Rak, J., and Kerbel, R. S. (2001) Acquired resistance to the antitumor effect of epidermal growth factor receptor-blocking antibodies in vivo: a role for altered tumor angiogenesis. *Cancer Res* **61**, 5090-5101

263. Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M., and Ono, M. (2002) ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res* **62**, 2554-2560
264. Baker, C. H., Kedar, D., McCarty, M. F., Tsan, R., Weber, K. L., Bucana, C. D., and Fidler, I. J. (2002) Blockade of epidermal growth factor receptor signaling on tumor cells and tumor-associated endothelial cells for therapy of human carcinomas. *Am J Pathol* **161**, 929-938
265. Kim, H. S., Shin, H. S., Kwak, H. J., Cho, C. H., Lee, C. O., and Koh, G. Y. (2003) Betacellulin induces angiogenesis through activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in endothelial cell. *FASEB J* **17**, 318-320
266. Hirata, A., Uehara, H., Izumi, K., Naito, S., Kuwano, M., and Ono, M. (2004) Direct inhibition of EGF receptor activation in vascular endothelial cells by gefitinib ('Iressa', ZD1839). *Cancer Sci* **95**, 614-618
267. Speleman, L., Kerrebijn, J. D., Look, M. P., Meeuwis, C. A., Foekens, J. A., and Berns, E. M. (2007) Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* **29**, 341-350
268. Ruokolainen, H., Paakko, P., and Turpeenniemi-Hujanen, T. (2005) Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 is prognostic in head and neck squamous cell carcinoma: comparison of the circulating and tissue immunoreactive protein. *Clin Cancer Res* **11**, 3257-3264
269. Busser, B., Sancey, L., Brambilla, E., Coll, J. L., and Hurbin, A. (2011) The multiple roles of amphiregulin in human cancer. *Biochim Biophys Acta* **1816**, 119-131
270. Bordoli, M. R., Stiehl, D. P., Borsig, L., Kristiansen, G., Hausladen, S., Schraml, P., Wenger, R. H., and Camenisch, G. (2011) Prolyl-4-hydroxylase PHD2- and hypoxia-inducible factor 2-dependent regulation of amphiregulin contributes to breast tumorigenesis. *Oncogene* **30**, 548-560
271. Xu, B., and Liu, P. (2009) 5-FU pretreatment potentiates cisplatin-induced apoptosis through up-regulation of thrombospondin-1 in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Chemother Pharmacol* **63**, 1181-1183
272. Jouan-Hureaux, V., Boura, C., Merlin, J. L., and Faivre, B. Modulation of endothelial cell network formation in vitro by molecular signaling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) exposed to cetuximab. *Microvasc Res*
273. Kuwai, T., Nakamura, T., Sasaki, T., Kim, S. J., Fan, D., Villares, G. J., Zigler, M., Wang, H., Bar-Eli, M., Kerbel, R. S., and Fidler, I. J. (2008) Phosphorylated epidermal growth factor receptor on tumor-associated endothelial cells is a primary target for therapy with tyrosine kinase inhibitors. *Neoplasia* **10**, 489-500
274. Li, S., Schmitz, K. R., Jeffrey, P. D., Wiltzius, J. J., Kussie, P., and Ferguson, K. M. (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301-311
275. Yang, X. D., Jia, X. C., Corvalan, J. R., Wang, P., and Davis, C. G. (2001) Development of ABX-EGF, a fully human anti-EGF receptor monoclonal antibody, for cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **38**, 17-23
276. Francoual, M., Etienne-Grimaldi, M. C., Formento, J. L., Benchimol, D., Bourgeon, A., Chazal, M., Letoublon, C., Andre, T., Gilly, N., Delpero, J. R., Lasser, P., Spano, J. P., and Milano, G. (2006) EGFR in colorectal cancer: more than a simple receptor. *Ann Oncol* **17**, 962-967
277. Hickinson, D. M., Marshall, G. B., Beran, G. J., Varella-Garcia, M., Mills, E. A., South, M. C., Cassidy, A. M., Acheson, K. L., McWalter, G., McCormack, R. M., Bunn, P. A., French, T., Graham, A., Holloway, B. R., Hirsch, F. R., and Speake, G.

(2009) Identification of biomarkers in human head and neck tumor cell lines that predict for in vitro sensitivity to gefitinib. *Clin Transl Sci* **2**, 183-192

278. Azemar, M., Schmidt, M., Arlt, F., Kennel, P., Brandt, B., Papadimitriou, A., Groner, B., and Wels, W. (2000) Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo. *Int J Cancer* **86**, 269-275
279. Kruser, T. J., and Wheeler, D. L. (2010) Mechanisms of resistance to HER family targeting antibodies. *Exp Cell Res* **316**, 1083-1100
280. Egloff, A. M., and Grandis, J. R. (2009) Improving Response Rates to EGFR-Targeted Therapies for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Candidate Predictive Biomarkers and Combination Treatment with Src Inhibitors. *J Oncol* **2009**, 896407
281. Mriouah, J., Boura, C., Pinel, S., Chretien, A. S., Fifre, A., Merlin, J. L., and Faivre, B. (2010) Cellular response to cetuximab in PTEN-silenced head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* **37**, 1555-1563
282. Qiu, W., Schonleben, F., Li, X., Ho, D. J., Close, L. G., Manolidis, S., Bennett, B. P., and Su, G. H. (2006) PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **12**, 1441-1446
283. Kalish, L. H., Kwong, R. A., Cole, I. E., Gallagher, R. M., Sutherland, R. L., and Musgrove, E. A. (2004) Deregulated cyclin D1 expression is associated with decreased efficacy of the selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* **10**, 7764-7774
284. Liu, S. C., Bassi, D. E., Zhang, S. Y., Holoran, D., Conti, C. J., and Klein-Szanto, A. J. (2002) Overexpression of cyclin D2 is associated with increased in vivo invasiveness of human squamous carcinoma cells. *Mol Carcinog* **34**, 131-139
285. Mehta, V. B., and Besner, G. E. (2007) HB-EGF promotes angiogenesis in endothelial cells via PI3-kinase and MAPK signaling pathways. *Growth Factors* **25**, 253-263
286. Buharalioglu, C. K., Song, C. Y., Yaghini, F. A., Ghafoor, H. U., Motiwala, M., Adris, T., Estes, A. M., and Malik, K. U. (2011) Angiotensin II-induced process of angiogenesis is mediated by spleen tyrosine kinase via VEGF receptor-1 phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**, H1043-1055
287. Qayum, N., Muschel, R. J., Im, J. H., Balathasan, L., Koch, C. J., Patel, S., McKenna, W. G., and Bernhard, E. J. (2009) Tumor vascular changes mediated by inhibition of oncogenic signaling. *Cancer Res* **69**, 6347-6354
288. Cerniglia, G. J., Pore, N., Tsai, J. H., Schultz, S., Mick, R., Choe, R., Xing, X., Durduran, T., Yodh, A. G., Evans, S. M., Koch, C. J., Hahn, S. M., Quon, H., Sehgal, C. M., Lee, W. M., and Maity, A. (2009) Epidermal growth factor receptor inhibition modulates the microenvironment by vascular normalization to improve chemotherapy and radiotherapy efficacy. *PLoS One* **4**, e6539
289. Bates, D. O., Cui, T. G., Doughty, J. M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J. D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S. J. (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **62**, 4123-4131
290. Yang, X. D., Roskos, L. K., Davis, C. G., and Schwab, G. (2005) From XenoMouse® technology to panitumumab. in Cancer Drug Discovery and Development. *eds. W.J. LaRochelle & R.A. Shimkets* **2005**, 647Ŕ657
291. Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D. J., and Kang, X. (2009) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation. *Int J Oncol* **34**, 25-32

292. Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K. T., and Harari, P. M. (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944-3956
293. Cui, W., Fowlis, D. J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., and Akhurst, R. J. (1996) TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* **86**, 531-542
294. Samarakoon, R., Higgins, C. E., Higgins, S. P., and Higgins, P. J. (2009) TGF-beta1-Induced Expression of the Poor Prognosis SERPINE1/PAI-1 Gene Requires EGFR Signaling: A New Target for Anti-EGFR Therapy. *J Oncol* **2009**, 342391
295. Homer, J. J., Greenman, J., and Stafford, N. D. (2002) Circulating angiogenic cytokines as tumour markers and prognostic factors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* **27**, 32-37
296. Chen, L., and Hu, G. F. (2010) Angiogenin-mediated ribosomal RNA transcription as a molecular target for treatment of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **46**, 648-653
297. Jameson, M. J., Beckler, A. D., Taniguchi, L. E., Allak, A., Van Wagner, L. B., Lee, N. G., Thomsen, W. C., Hubbard, M. A., and Thomas, C. Y. (2011) Activation of the insulin-like growth factor-1 receptor induces resistance to epidermal growth factor receptor antagonism in head and neck squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Ther*
298. Castellana, D., Toti, F., and Freyssinet, J. M. (2010) Membrane microvesicles: macromessengers in cancer disease and progression. *Thromb Res* **125 Suppl 2**, S84-88
299. Lawrie, A. S., Albanyan, A., Cardigan, R. A., Mackie, I. J., and Harrison, P. (2009) Microparticle sizing by dynamic light scattering in fresh-frozen plasma. *Vox Sang* **96**, 206-212
300. Connor, D. E., Exner, T., Ma, D. D., and Joseph, J. E. (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost* **103**, 1044-1052
301. Jimenez, J. J., Jy, W., Mauro, L. M., Soderland, C., Horstman, L. L., and Ahn, Y. S. (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* **109**, 175-180
302. Dignat-George, F., Freyssinet, J. M., and Key, N. S. (2009) Centrifugation is a crucial step impacting microparticle measurement. *Platelets* **20**, 225-226; author reply 227-228
303. Heyde, H. C. v. d. (2011) Flow cytometry protocols. *Methods in molecular biology*
304. Robert, S., Poncelet, P., Lacroix, R., Arnaud, L., Giraudo, L., Hauchard, A., Sampol, J., and Dignat-George, F. (2009) Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* **7**, 190-197
305. Ayers, L., Kohler, M., Harrison, P., Sargent, I., Dragovic, R., Schaap, M., Nieuwland, R., Brooks, S. A., and Ferry, B. (2011) Measurement of circulating cell-derived microparticles by flow cytometry: sources of variability within the assay. *Thromb Res* **127**, 370-377
306. Aras, O., Shet, A., Bach, R. R., Hysjulien, J. L., Slungaard, A., Hebbel, R. P., Escolar, G., Jilma, B., and Key, N. S. (2004) Induction of microparticle- and cell-associated intravascular tissue factor in human endotoxemia. *Blood* **103**, 4545-4553
307. Perez-Pujol, S., Marker, P. H., and Key, N. S. (2007) Platelet microparticles are heterogeneous and highly dependent on the activation mechanism: studies using a new digital flow cytometer. *Cytometry A* **71**, 38-45

308. Helley, D., Banu, E., Bouziane, A., Banu, A., Scotte, F., Fischer, A. M., and Oudard, S. (2009) Platelet microparticles: a potential predictive factor of survival in hormone-refractory prostate cancer patients treated with docetaxel-based chemotherapy. *Eur Urol* **56**, 479-484
309. Ghiran, I., and Kuo, W. P. (2010) Examining the role of microvesicles to develop prognostic and diagnostic assays. *J Appl Oral Sci* **18**, i
310. Smalley, D. M., Sheman, N. E., Nelson, K., and Theodorescu, D. (2008) Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res* **7**, 2088-2096
311. Tesselaar, M. E., Romijn, F. P., Van Der Linden, I. K., Prins, F. A., Bertina, R. M., and Osanto, S. (2007) Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost* **5**, 520-527
312. Rupp, A. K., Rupp, C., Keller, S., Brase, J. C., Ehehalt, R., Fogel, M., Moldenhauer, G., Marme, F., Sultmann, H., and Altevogt, P. (2011) Loss of EpCAM expression in breast cancer derived serum exosomes: role of proteolytic cleavage. *Gynecol Oncol* **122**, 437-446
313. Taylor, D. D., and Gercel-Taylor, C. (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **110**, 13-21
314. Owens, A. P., 3rd, and Mackman, N. (2011) Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ Res* **108**, 1284-1297
315. Key, N. S. (2010) Analysis of tissue factor positive microparticles. *Thromb Res* **125 Suppl 1**, S42-45
316. Thomas, G. M., Panicot-Dubois, L., Lacroix, R., Dignat-George, F., Lombardo, D., and Dubois, C. (2009) Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* **206**, 1913-1927
317. Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Giusti, I., Marchetti, D., Borsotti, P., Millimaggi, D., Giavazzi, R., Pavan, A., and Dolo, V. (2006) Bioavailability of VEGF in tumor-shed vesicles depends on vesicle burst induced by acidic pH. *Neoplasia* **8**, 96-103

Les thérapies ciblées anti-EGFR ont-elles un réel effet anti-angiogénique ? Etude *in vitro* de l'angiogenèse induite par des cellules cancéreuses des VADS traitées par le cetuximab.

La surexpression du récepteur EGFR a un rôle majeur dans le développement des carcinomes des voies aérodigestives supérieures (VADS) et son inhibition par les anticorps anti-EGFR (cetuximab) induit un effet anti-tumoral mais pourrait également avoir un effet anti-angiogénique. Cependant, les effets de ces agents sur l'angiogenèse et les cellules endothéliales (CE) n'ont pas réellement été évalués. L'objectif de ce travail est d'étudier l'angiogenèse induite par les molécules libérées par les cellules tumorales des VADS (Cal27, FaDu) dans les milieux de culture en présence ou non de cetuximab, appelés milieux conditionnés (CM). Le cetuximab n'a pas d'effet direct significatif sur les CE. Il induit une diminution de la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales mais paradoxalement, les CM obtenus induisent un effet pro-angiogénique. L'analyse de la composition des CM ne permet pas d'identifier de molécule clé responsable de cet effet, le cetuximab diminuant à la fois la sécrétion tumorale des facteurs pro- et anti-angiogéniques. Pour expliquer ce paradoxe et en accord avec la littérature, nous avons mis en évidence une libération de microvésicules par nos cellules tumorales (TMV), TMV exprimant EGFR et TF, et une régulation de cette libération et de leur contenu par le cetuximab. Ces TMV peuvent interagir avec les CE et le cetuximab favoriserait cette interaction. La caractérisation de ces TMV et leur rôle dans le processus angiogénique en réponse ou non au cetuximab permettront dans le futur de comprendre la réelle activité des anticorps anti-EGFR sur l'angiogenèse.

Mots-clés : Angiogenèse, Cancers des VADS (HNSCC), Thérapies ciblées, Cellules endothéliales, anti-EGFR, microvésicules tumorales.

Are the anti-EGFR targeted therapies having an anti-angiogenic effect? *In vitro* study of angiogenesis induced by head and neck squamous cell carcinoma exposed to cetuximab.

Overexpression of EGFR has a major role in the development of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and its inhibition by anti-EGFR antibodies (cetuximab) induced an anti-tumor effect but could also induce an anti-angiogenic effect. However, the effects of these agents onto angiogenesis and endothelial cells (EC) have not really been evaluated. The objective of this work is to study angiogenesis induced by mediators released by head and neck squamous carcinoma cells (Cal27, FaDu) in culture media with or without cetuximab exposure, known as conditioned media (CM). Cetuximab has no significant direct effect on EC. It induces a decrease in the secretion of VEGF by tumor cells but, paradoxically, the CM induces a pro-angiogenic effect. The analysis of the composition of the CM does not allow us to identify a key molecule responsible for this effect because cetuximab decreases the secretion of both pro- and anti-angiogenic factors by tumor cells. To explain this paradox and in agreement with the literature, we highlighted the release of microvesicles by our tumor cells (TMV), TMV which express EGFR and TF, and regulation of this release and the content of TMV after cetuximab exposure. These TMV may interact with the EC and cetuximab increases this interaction. Further characterization of TMV and studying their role in the angiogenic process in response to cetuximab will allow us in the future to understand the real activity of anti-EGFR antibodies onto angiogenesis.

Keywords : Angiogenesis, HNSCC, Targeted therapy, Endothelial Cells, anti-EGFR, tumor microvesicles.