

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale Science, Médecine, Santé

Faculté de Médecine

Laboratoire de Biochimie médicale

Année : 2003

Thèse N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biochimie et Biologie moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

Aurélie DUTOUR

Le 24 octobre 2003

APPLICATION D'UNE STRATEGIE DE THERAPIE GENIQUE
ANTIANGIOGENIQUE NON VIRALE SUR UN MODELE
D'OSTEOSARCOME ORTHOTOPIQUE CHEZ LE RAT
IMMUNOCOMPETENT

Directeur de Thèse : Professeur Michel RIGAUD

Jury

Mr le professeur PHILIP

Président

Mr le professeur PHILIP

Rapporteur

Mr le professeur DELLIAN

Rapporteur

Mr le professeur RIGAUD

Examineur

Mr le professeur CHARISSOUX

Examineur

Mr le docteur MICHAELIS

Examineur

Mme le docteur KALETTA

Examineur

Remerciements

A Monsieur le professeur RIGAUD,

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire,
Faculté de Médecine de Limoges
Biologiste des Hôpitaux, Chef du Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimies
des Explorations Fonctionnelles, CHRU de Limoges,
Directeur de Thèse,

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Je vous remercie de votre confiance, de votre soutien, de l'opportunité que vous m'avez offerte de réaliser ce travail en cotutelle avec Munich Biotech.

Votre soutien et vos précieux conseils m'ont permis de mener ce travail de thèse dans de très bonnes conditions et je vous exprime toute ma gratitude et mon profond respect.

A Monsieur le professeur PHILIP,

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier
Directeur Général Centre Léon Bérard

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail, d'en être le rapporteur et le président du jury. Je vous suis très reconnaissante du temps que vous avez consacré à la lecture de mon mémoire. Je vous remercie pour vos précieux conseils concernant la rédaction de ce manuscrit.

Je tiens à vous assurer de l'expression de mon profond respect et vous remercie de votre présence.

A Monsieur le professeur DELIAN,

Department of Otorhinolaryngology
University of Munich

C'est un plaisir et un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger ce travail en tant que rapporteur étranger et je suis très sensible à votre présence dans ce jury. Je vous remercie du temps que vous avez bien voulu m'accorder.

Croyez à ma plus vive reconnaissance et à l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le professeur CHARISSOUX,

Professeur des Universités de Chirurgie orthopédique et traumatologique
Faculté de Médecine de Limoges
Chirurgien des Hôpitaux

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury en tant qu'examinateur. Je tiens à vous remercier pour votre grande disponibilité, votre gentillesse et de m'avoir transmis votre expérience concernant l'ostéosarcome greffable de rat.
Je vous en suis très reconnaissante et vous témoigne toute ma gratitude.

A Monsieur le docteur MICHAELIS,

Directeur du Département Recherche et Développement
Munich Biotech

Je suis très sensible à votre présence dans ce jury. Je vous remercie de m'avoir accueillie avec beaucoup de gentillesse au sein du département Recherche et Développement de votre société. Tout au long de ce travail, j'ai pu bénéficier de vos conseils et j'ai pu apprécier votre disponibilité.
Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Madame le docteur KALETTA,

Directeur du Département Biologie Moléculaire
Munich Biotech

C'est un grand plaisir de te compter parmi les membres de ce jury. Je tiens à te remercier de m'avoir intégrée dans ton équipe, de ta gentillesse et de m'avoir aidé pour les corrections de mes textes allemands. Ta grande disponibilité et ta rigueur scientifique m'ont permis de poursuivre ce travail dans de bonnes conditions.
Sois assurée de ma reconnaissance.

A Monsieur le professeur STURTZ,

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire,
Faculté de Médecine de Limoges
Praticien Hospitalier, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimies des
Explorations Fonctionnelles, CHRU de Limoges,

Je vous remercie pour votre disponibilité, vos conseils pour la rédaction de ce travail et vos encouragements.

Soyez assuré de mon profond respect.

A Monsieur le professeur BRETON,

Professeur honoraire des Universités de Biochimie et Biologie moléculaire,
Faculté de Médecine de Limoges
Biologiste des Hôpitaux

Vous n'avez pas oublié de me signaler des notices bibliographiques qui auraient pu m'échapper et je vous remercie pour votre gentillesse et pour l'aide que vous m'avez apportée. Soyez assuré de mon profond respect.

A Madame le docteur Hélène RABINOVITCH-CHABLE,

Maître de conférence des Universités de Biochimie
Faculté de Médecine de Limoges
Praticien Hospitalier Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimie des
Explorations fonctionnelles CHRU de Limoges

Depuis quatre ans vous m'avez conseillée et soutenue et je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité. Votre présence et vos conseils m'ont permis d'éviter des écueils et d'avancer dans mes recherches.

Je vous témoigne ici ma reconnaissance et je vous assure de toute ma gratitude. Merci beaucoup, de m'avoir transmis votre expérience et votre rigueur scientifique.

A Madame le docteur Jeanne COOK-MOREAU,

Maître de conférence des Universités d'Immunologie
Faculté de Pharmacie de Limoges

Ton aide précieuse pour les oraux, les traductions, m'ont permis d'appréhender les épreuves avec moins de stress. Sois remerciée pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton aide amicale.
See you next in Texas !

A mademoiselle le docteur Karine FAUCHER

Je tiens à te remercier pour ton soutien, tes conseils et pour avoir relu mon manuscrit de manière pertinente. Ton amitié et ton humour m'ont beaucoup apporté au cours de ces années. Je te souhaite une grande réussite tant personnelle que professionnelle.

A mademoiselle le docteur Guislaine BARRIÈRE

Je voudrais te remercier pour tes conseils, ta gentillesse que tu m'as témoigné au cours de ces années de thèse. Je te remercie pour avoir relu mon manuscrit de façon efficace. Je suis certaine que tes qualités te permettront de réaliser tes projets.

A mademoiselle Barbara AKLA

En témoignage des bons moments passés au sein de l'équipe de Biochimie. Je te remercie pour nos discussions, ta joie de vivre. Je te souhaite une grande réussite pour ton avenir professionnel et personnel.

A monsieur Dany LECLERS

Ta bonne humeur et ton dévouement sont des atouts pour le laboratoire. Je te remercie pour avoir relu mon manuscrit de façon rapide et pertinente. Je te souhaite beaucoup de succès pour la réalisation de ta thèse.

A monsieur le professeur François PARAF
A monsieur le docteur Jacques MONTEIL
A monsieur le docteur Fabrice FIORENZA

Soyez assurés de ma profonde gratitude pour votre participation à ce travail. Vos compétences m'ont été précieuses. J'ai pu apprécier votre gentillesse, votre disponibilité et votre sérieux.
Avec toute mon amitié.

A Monsieur le docteur NAUJOKS,
Directeur de la société MunichBiotech

Je vous remercie de m'avoir bien accueillie dans votre entreprise. C'est un privilège et un plaisir pour moi d'avoir pu travailler avec vous. J'ai pu apprécier votre gentillesse et votre sens de l'écoute. J'ai pu bénéficier de vos conseils et je vous exprime toute ma reconnaissance.

Au département Biologie de MunichBiotech

Je vous remercie chaleureusement tous de m'avoir aussi bien accueillie, et de votre bienveillance face à mes fautes de grammaire allemande
Votre gentillesse, et votre soutien ont été précieux notamment au cours de ces derniers mois.
Trouvez ici le témoignage de mon amitié.

Je tiens à exprimer mes remerciements et mon amitié à Annette LABROUSSE, Marie Hélène PRADEAU, Christiane BOURREAU, ainsi qu'au personnel du Laboratoire de Biochimie du CHU Dupuytren.

Ce travail a été réalisé grâce au financement du Comité de la Haute Vienne de la Ligue contre le Cancer. Nous exprimons nos remerciements à cet organisme.

A mes parents,

A ma famille,

A mes amis,

Merci de votre soutien.

La science n'a pas de patrie.

Louis PASTEUR

LISTE DES ABREVIATIONS

^{18}F FDG : 18 Fluoro Désoxyglucose

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP : technétium

Ac : Anticorps

ADM : adriamycine

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm : Acide ribonucléique messenger

BCD : bléomycine

BET : Bromure d'éthidium

b-FGF : Basic fibroblast growth factor

BSA : Albumine sérique bovine

CD-5-FC : cytosine déaminase-5 fluorocytosine

Cdk : cyclin dependent kinases

CIS-DDP ou CDDP : cis-dichloro-diamino-platinum

CSH : cellules souches hématopoïétiques

DEPC : Diethyl pirocarbonate

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

dNTP : Dinucléotides triphosphate

DO : Densité optique

DOGS : Dioctadecylamidoglycylspermine

DOPE : Dioléoylphosphatidyléthanolamine phospholipide neutre

DOTAP : Dioleoyloxy-3-(triméthylammonio)propane

DOTMA : Bromure de dioléoyloxy-propyl-triméthylammonium

DTT : Dithiothéitol

DX : Doxorubicine

ECL : « Enhancer chemiluminescence » : amplificateur de chimioluminescence

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

EGF : Epidermal growth factor

EIA : "Enzyme immuni sorbent assay" : analyses immunoenzymatiques

FITC : Isothiocyanate de fluorescence

GCV : Gancyclovir
GM-CSF : Granocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factors
HIV : Virus de l'immunodéficience humaine
HSV TK : Herpes Simplex Virus Thymidine Kinas
IFN : Interféron
IFN γ : interféron gamma
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
IT : Intratumoral
IV :Intraveineux
kb : Kilo bases
kDa : Kilo daltons
LB :Luria broth
LDH : Lacticodéshydrogénase
MCS : Multisite de clonage
MDR : Multidrug Resistance
MEC : Matrice extracellulaire
MMPs : Matrix metalloproteinases
MTP-PE : Muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine
pb : Paire de base
PBS : Phosphate buffer saline
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
PDGF : platelet-derived growth factor
PFA : Paraformaldéhyde
Pgp : Glycoprotéine P
PHA : Phosphatases alcalines sériques
PM : Poids moléculaire
RNase : Ribonucléase
ROI : Region of interest
SDS : Sodium dodécyl sulfate
PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide
SVF : Sérum de veau foetal

TAE : Tris-EDTA-acide acétique
TGF : Transforming growth factor
TILs : Lymphocytes T infiltrants les tumeurs
TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase
TnC : Troponine C
TNF : Tumor necrosis factor
TNF α : Tumor Necrosis Factor α
TnI : Troponine I
TnT : Troponine T
UV : Ultraviolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

SOMMAIRE

SOMMAIRE	11
INTRODUCTION.....	18
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER	22
II. OSTÉOSARCOME	50
III. ANGIOGENÈSE TUMORALE ET THÉRAPIES ANTIANGIOGÉNIQUES.....	61
MATERIEL ET MÉTHODES.....	85
I. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉES À LA CONSTRUCTION DU PLASMIDE RECOMBINANT PSECTNITAG	86
II. CULTURE CELLULAIRE	96
III. TRANSFECTION DES CELLULES	101
IV. TECHNIQUES DE DÉTECTION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES	107
VI. ESSAI DE THÉRAPIE GÉNIQUE CHEZ DES RATS PORTEURS D'OSTÉOSARCOME	112
RESULTATS	126
I. CONSTRUCTION DU PLASMIDE PSECTNITAG	129
II. VÉRIFICATION DE LA FONCTIONNALITÉ DES PLASMIDES RECOMBINANTS	135
III. EFFETS DE LA TRANSFECTION DES ADNC DE L'ENDOSTATINE ET DE LA TNI SUR LES MODÈLES CELLULAIRES	151
IV. ADMINISTRATION DES LIPOPLEXES AUX RATS PORTEURS D'OSTÉOSARCOME	171
DISCUSSION.....	208

CONCLUSION.....	226
BIBLIOGRAPHIE	228
ANNEXES	246
TABLE DES MATIÈRES	251
LISTE DES TABLEAUX.....	258
LISTE DES FIGURE S.....	260

Résumé

L'angiogenèse, définie comme la mise en place d'un nouveau réseau vasculaire à partir de vaisseaux préexistants, est un processus indispensable à la croissance tumorale. Parmi les stratégies ayant pour but d'empêcher ou de ralentir l'angiogenèse tumorale, celles ayant recours aux technologies de l'ADN recombinant sont de plus en plus employées dans des essais précliniques. Nous avons réalisé une étude comparative de l'action antiangiogénique des gènes de l'endostatine et de la troponine I musculaire *in vitro* et *in vivo* ; les séquences codantes sont complexés à des liposomes cationiques ou lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag. Nous avons montré *in vitro* que les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag induisent de manière spécifique un retard de croissance et une apoptose des cellules endothéliales. *In vivo*, les lipoplexes sont administrés à des rats porteurs d'un ostéosarcome. Sur ce modèle tumoral orthotopique, nous avons constaté l'inefficacité de la TnI à induire un retard de la croissance de la tumeur. Le fait majeur mis en évidence sur ce même modèle, est l'efficacité de la thérapie génique utilisant l'endostatine. En effet, l'administration par voie intraveineuse des lipoplexes/pSecEndo entraîne une diminution de la vascularisation et de la croissance tumorales, et prévient la dissémination métastatique.

Mots clés :

- ostéosarcome
- thérapie génique antiangiogénique
- liposomes cationiques
- endostatine
- troponine I

Abstract :

Application of a non viral antiangiogenic gene therapy strategy on a orthotopic osteosarcoma model grafted on immunocompetent rats

Angiogenesis, or the formation of a new vascular network from a preexisting one, is an essential step for tumor growth. Among the antiangiogenic therapies, those using the using recombinant DNA have become more and more used in preclinical trials. In this study, we performed an *in vitro* and *in vivo* comparative study regarding the antiangiogenic activity of the endostatin and the muscular troponin I gene. The coding sequences were complexed to cationic liposomes ; the resulting lipoplexes were named lipoplexe pSecEndo and lipoplexe pSecTnITag. *In vitro* we showed that both lipoplexe pSecEndo and pSecTnITag can specifically induce growth inhibition and apoptosis of endothelial cells. The lipoplexes were tested *in vivo* on a rat osteosarcoma model. In this model, the TnI gene was unable to induce tumor growth delay. The *in vivo* most important result is the efficiency of the gene therapy strategy using the endostatin. The intravenous administration of pSecEndo lipoplexe induced a regression of tumor vascular density, a tumor growth delay and prevent the metastatic spread.

Keywords :

- osteosarcoma
- antiangiogenic gene therapy
- cationic liposomes
- endostatin
- troponin I

Zusammenfassung

Einer der häufigsten Tumoren des Skelettsystems, der besonders bei Jugendlichen auftritt, ist das Osteosarcom. Es entwickelt sich schnell und metastasiert im fortgeschrittenen Stadium in die Lunge. Behandelt wird das Osteosarcom normalerweise durch einen chirurgischen Eingriff, der den Tumor entfernt. Anschließend erfolgt fast immer eine chemotherapeutische Behandlung meist mit Methothrexat, Doxorubicin aber auch Cisplatin, zur vollständigen Zerstörung noch vorhandener Tumorzellen. Häufig ist der Tumor aber chemoresistent und reagiert auch nicht auf eine Strahlentherapie. Besonders diese Tumoren und auch solche, die nach einer Chemotherapie rezidieren, könnten von einem neuartigen anti-angiogenetischen Therapiekonzepten profitieren.

Eine anti-angiogenetische Therapie beruht auf der Zerstörung der Blutgefäße des Tumors, der dadurch von der Nahrungszufuhr abgeschnitten ist und sich nicht weiter entwickeln kann. Anders als bei herkömmlichen Therapien, bei denen das Chemotherapeutikum direkt auf die Tumorzelle einwirkt, ist hier die körpereigene, nicht entartete proliferierende Endothelzellen die Zielzelle. Deshalb sollte eine anti-angiogenetische Therapie unabhängig vom Tumortyp möglich sein und keine Resistenz entwickeln.

Das Prinzip der anti-angiogenetischen Therapie wurde in mehreren Maus Tumormodellen bestätigt. Wird ein recombinantes Protein verwendet, gibt es jedoch häufig Schwierigkeiten dieses in ausreichender Menge und hohem Reinheitsgrad herzustellen. Ein weiterer Nachteil der anti-angiogenetischen Therapie mittels Proteinen ist die Länge der Behandlung bei häufigen Injektionen. Die anti-angiogenetische Gentherapie könnte diese Nachteile beheben und auch die Wirkung von Strahlen und Chemotherapie verstärken.

Das Ziel dieser Studie war es, die Wirkung einer anti-angiogenetischen nicht viralen Gentherapie im Osteosarcom zu zeigen. Eine Ausweitung auf andere solide Tumoren wäre möglich.

In dieser Studie wurden der anti-angiogenetische Effekt zweier Gene, Endostatin und Troponin I (TnI) untersucht. Endostatin ist ein 20 kd großes c-terminales Fragment des Kollagen XVIII. Seine anti-angiogenetischen Eigenschaften wurden zuerst von O'Reilly beschrieben. In Tumormodellen in Nagern wurde seine Wirksamkeit gezeigt. Troponin I ist eine Untereinheit des Troponin Komplexes, welcher die Muskelkontraktion steuert. Moses zeigte die ausgeprägte spezifische Inhibition der Angiogenese *in vitro* und *in vivo*.

Um die anti-angiogenetischen Eigenschaften der beiden Faktoren zu zeigen wurden die entsprechenden Gene zuerst in einen Expressionsvektor (pSecTag2), der die Sekretion des gebildeten Proteins erlaubt, kloniert. Die Plasmide wurden in kationische Liposomen verpackt (lipoplex/pSecEndo und lipoplex/pSecTnITag) und in Zellkulturmodellen und *in vivo* getestet. *In vitro* ergab sich eine spezifische Hemmung von Endothelzellen. Eine verstärkte Apoptoserate konnte nachgewiesen werden.

In vivo wurde ein transplantiertes orthotopes Osteosarcom in der Ratte verwendet, welches dem humanen Osteosarcom sehr ähnlich ist. Erstaunlicherweise ließ sich das Wachstum durch Gentherapie des Troponin I's nicht hemmen. Auch hatte sie keinen Einfluss auf die Gefäßdichte im Tumor.

Eine Gentherapie unter Verwendung des Endostatin Gens zeigte jedoch Erfolg. Neben einer Verlangsamung des Tumorwachstums konnte in einigen Fällen ein komplettes Verschwinden des Tumors beobachtet werden. Das Hauptresultat war aber das vollständige Ausbleiben der

Metastasierung in die Lunge, die bei allen Referenztieren auftrat. Auch Mikro-Metastasen ließen sich nicht nachweisen. Eine Immunfärbung der angefertigten Tumorschnitte zeigte eine deutliche Verminderung der Vaskularisation. Jedoch ließ sich keine erhöhte Apoptoserate nachweisen.

In dieser Studie wurde deutlich gezeigt, dass eine systemische Verwendung von Lipoplexen mit einem Plasmid, das für eine sekretierte Form des Endostatin kodiert, zu einer Regression des Tumors führen kann und die Metastasierung des Tumors vollständig verhindert. Diese starke anti-Tumor Wirkung wird in weiteren Tumormodellen, auch mit unterschiedlichen Entwicklungsformen des Tumors, bestätigt werden müssen.

Die Endothelzell spezifische Wirkung der Lipoplexe auf das Tumorblutgefäßsystem wurde durch einen nicht erhöhten Endostatin Level im Blut bestätigt. Daher kann eine solche intravenöse applizierte Gentherapie das Risiko der Wirkung des Proteins auf andere Zellen des Körpers vermindern.

INTRODUCTION

La croissance d'une tumeur solide est fortement dépendante de la mise en place d'un réseau vasculaire adéquat, faisant de l'angiogenèse une cible attractive pour de nouvelles approches thérapeutiques. L'évolution des technologies utilisant l'ADN recombinant et la découverte des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse ouvrent la voie à la thérapie génique antiangiogénique.

L'endostatine est un des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse les mieux connus. Cette protéine est générée par le clivage protéolytique du collagène XVIII. Présentée comme l'un des plus puissants inhibiteurs de l'angiogenèse, l'endostatine, est actuellement le seul inhibiteur endogène de l'angiogenèse à avoir intégré des essais cliniques de phase I. Utilisée dans des approches de thérapie génique variées, est capable d'induire le ralentissement ou l'inhibition de la croissance de divers modèles tumoraux, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

Dans le travail que nous présentons, nous avons comparé le potentiel antiangiogénique du gène de l'endostatine à celui de la troponine I musculaire *in vitro* et *in vivo*. L'action des deux gènes est évaluée *in vivo* sur un ostéosarcome de rat greffé en position orthotopique qui présente les mêmes caractéristiques que l'ostéosarcome humain. L'ostéosarcome, tumeur très vascularisée et résistante à de nombreux traitements chimiothérapeutiques, est le type même des tumeurs qui peuvent bénéficier des avantages de la thérapie génique antiangiogénique.

L'étude bibliographique de ce manuscrit fera le point sur les principales stratégies de thérapie génique actuellement évaluées en cancérologie, rappellera quels sont les traitements conventionnels appliqués à l'ostéosarcome et détaillera mécanisme de l'angiogenèse et stratégies antiangiogéniques. Après avoir développé nos travaux portant sur l'évaluation de l'action antiangiogénique de deux gènes, l'endostatine et la troponine I dans le modèle

d'ostéosarcome de rat, nous discuterons les résultats exposés et évoquerons les perspectives découlant de cette étude.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Thérapie génique du cancer

I – 1. Généralités

La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule cible un gène d'intérêt thérapeutique qui doit pallier un dysfonctionnement génétique. En théorie, on distingue la thérapie génique germinale de la thérapie génique somatique. La première consiste en des modifications irréversibles du génome par correction d'une cellule germinale, entraînant une transmission du nouveau caractère à la descendance. Cette génothérapie est inapplicable à l'homme pour des raisons techniques mais surtout éthiques. La thérapie génique somatique désigne la correction phénotypique d'un groupe cellulaire déterminé et de sa descendance sans toucher au patrimoine génétique constitutionnel. Du point de vue éthique, cela correspond à une greffe ou à une transplantation. Si la thérapie génique somatique apparaît comme l'une des voies prometteuses pour guérir ou prévenir un certain nombre de maladies soit génétiques soit acquises, y compris le cancer, son usage implique la modification du patrimoine génétique de cellules vivantes, faisant resurgir le risque d'eugénisme. De plus, l'emploi de vecteurs viraux pour le transfert de gène pose des questions de sécurité, notamment relatives à l'utilisation de séquences d'ADN virales qui pourraient se recombiner *in vivo* et engendrer des particules virales pathogènes, ou générer des mutations insertionnelles.

La mise en œuvre de la thérapie génique n'a été rendue possible que depuis quelques années, grâce au développement des nouvelles techniques de l'ADN recombinant. L'essor de la thérapie génique repose sur la mise au point de méthodes de transfert sûres, efficaces, capables d'amener le gène d'intérêt dans la cellule cible, et d'assurer une expression durable de la protéine d'intérêt.

Dans le domaine de la cancérologie, plusieurs approches de thérapie génique sont envisagées. Elles concernent l'immunothérapie, la modification des fonctions des oncogènes

et des anti-oncogènes, les gènes de sensibilité à une prodrogue. Ces trois stratégies visent les cellules tumorales ; une approche différente consiste à bloquer le développement tumoral en inhibant l'angiogenèse tumorale. Ce sont ces différentes stratégies que nous allons envisager, après avoir présenté les méthodes de transfert par lesquelles les gènes peuvent être amenés à la cellule cible.

I – 2. Méthodes de transfert des gènes

Une des étapes importantes des protocoles basés sur une approche de thérapie génique est de faire pénétrer l'ADN à l'intérieur de la cellule cible. Jusqu'à présent, de nombreux systèmes de transfert de gènes ont été testés. Ces méthodes doivent répondre à plusieurs critères de sécurité, et d'efficacité de transfection des cellules cibles. Elles doivent être capables d'assurer une intensité et une stabilité d'expression des gènes thérapeutiques. L'évolution des connaissances des mécanismes cellulaires ainsi que les progrès des technologies de l'ADN recombinant, ont permis de nombreuses améliorations des techniques de transfert de gènes qui peuvent être distinguées en deux catégories : celles utilisant des vecteurs viraux et celles impliquant des vecteurs non viraux.

I – 2 – 1. Vecteurs de transfert viraux

I – 2 – 1 – 1. Principe des vecteurs viraux

Les virus sont d'excellents moyens pour introduire du matériel génétique dans une cellule. Les vecteurs viraux développés pour transfecter les cellules sont principalement des adénovirus et des rétrovirus recombinants.

Ces vecteurs ont en commun le principe d'action présenté sur la Figure B1 : les virus rendus inaptes à la réplication infectent la cellule cible, la transcription du gène d'intérêt s'effectue en détournant le métabolisme cellulaire, comme pour un virus normal.

La stratégie de construction de ces vecteurs viraux et rétroviraux est identique. Une partie du génome essentielle est déléetée à la réplication virale et remplacée par la cassette d'expression (gène d'intérêt avec son promoteur) dont la taille maximale est variable suivant le vecteur viral considéré. Ces gènes déléetés indispensables à la production de particules virales sont amenés dans la lignée cellulaire d'encapsidation par un second vecteur. L'utilisation de deux plasmides pour amener les séquences nucléotidiques virales a pour but d'éviter la recombinaison des séquences et la production de virus recombinants infectieux. Les cellules d'encapsidation, génétiquement modifiées, permettent la production de virus recombinants incapables de se propager en dehors des cellules cibles qu'ils atteignent. Ces dernières, en effet, ne possèdent pas le complément viral génomique nécessaire à la formation de nouvelles particules virales.

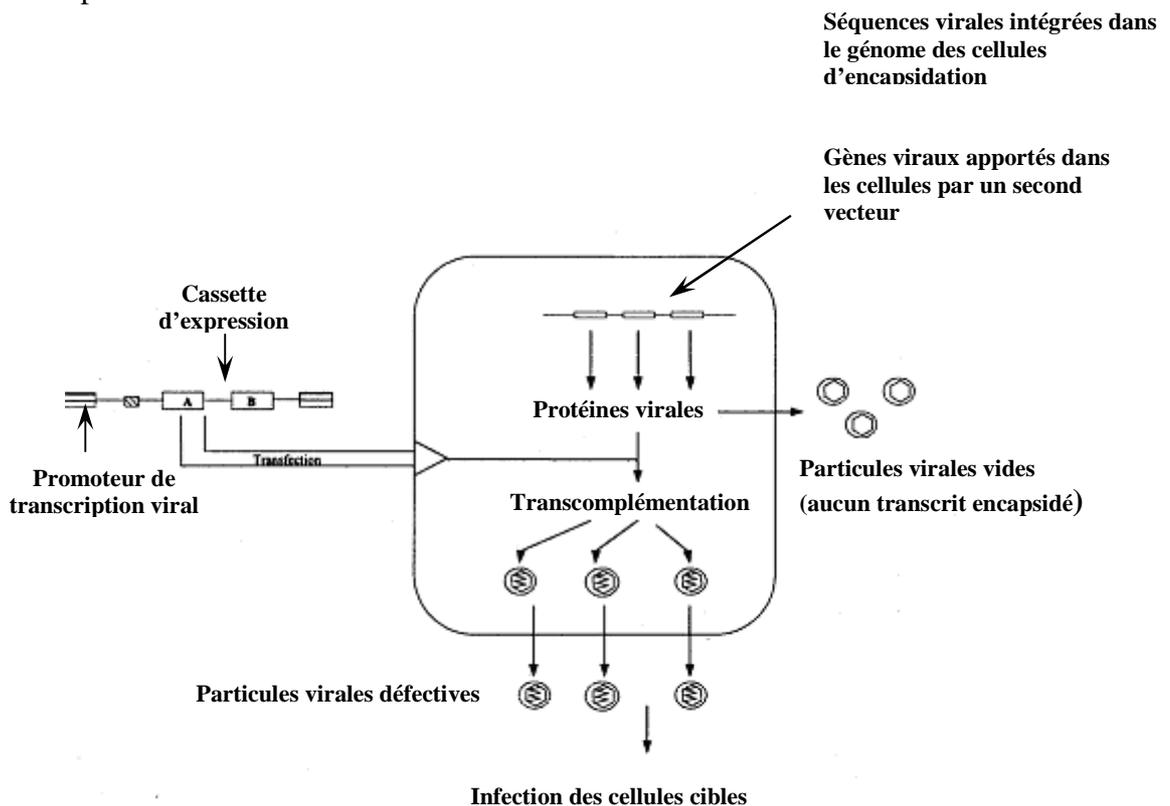


Figure B1 : Principe de la transfection utilisant les vecteurs viraux.

Fonctionnement d'une cellule productrice de particules virales défectives recombinantes.

Les caractéristiques des principaux vecteurs viraux employés actuellement sont regroupées dans le tableau B1. Nous n'allons pas présenter ici tous les vecteurs viraux, seuls les rétrovirus, adénovirus et AAV (Adeno Associated Virus) seront évoqués.

	Rétrovirus	Lentivirus	Adénovirus	Adenovirus Associated virus	HSV
Type de virus	ARN	ARN	ADN	ADN	ADN
Infection des cellules quiescentes	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Production à haut titre	+	++	++++	+	+++
Intégration dans le génome cellulaire	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Longueur des séquences intégrées	8 Kb	30 Kb	8 Kb	5 Kb	30 Kb
Stabilité	++	++	+	++	++
Limite à leur emploi	Insertion mutationnelle Production de titres viraux élevés difficile	Insertion mutationnelle Pathogénicité élevée	Stabilité moyenne Immunogénicité potentielle Risque de recombinaison avec un virus sauvage	Effet cytopathique Difficulté de régulation de l'expression du transgène	Immunogénicité potentielle

Tableau B1 : Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène

I – 2 – 1 – 2. Vecteurs rétroviraux

Les rétrovirus sont des virus à ARN capables de s'intégrer dans un génome hôte, modifiant définitivement la cellule. Le génome rétroviral est composé de deux séquences terminales, les LTR (Long Terminal Repeat) qui encadrent trois cadres de lecture. Les LTR ont un rôle de promoteur de la transcription et sont nécessaires à l'intégration provirale dans l'ADN cellulaire. Entre les deux LTR, se trouvent les gènes *gag* qui codent pour les protéines de la capsidite et les protéines de la matrice, les gènes *pol* qui codent pour une protéase, une reverse transcriptase (RT) et une intégrase, et enfin les gènes *env* qui sont à l'origine des protéines d'enveloppe. La RT synthétise un ADN double brin à partir de l'ARN.

Des protéines de la capsidite virale reconnaissent des récepteurs à la surface de la cellule cible, permettant la fusion des membranes et des bicouches lipidiques. Cette reconnaissance définit le spectre d'action du vecteur viral car les glycoprotéines de la capsidite virale reconnaissent des récepteurs qui sont spécifiques d'espèces animales mais aussi de types tissulaires. Une fois le matériel génétique libéré dans le cytoplasme de la cellule hôte, l'activité RT est stimulée permettant le passage de l'ARN à de l'ADN double brin. L'ADN proviral est transporté dans le noyau et s'insère en plusieurs sites dans le génome de la cellule hôte. Le provirus se comporte alors comme un gène cellulaire avec transcription, assemblage, maturation et relargage de particules rétrovirales.

L'utilisation des rétrovirus comme vecteurs de transfert implique que ces virus soient défectifs pour la réplication virale (Scharfmann *et al.*, 1991 ; Tabin *et al.*, 1982). Le vecteur conserve les séquences régulatrices indispensables (LTR). Les gènes *gag*, *pol*, et *env* sont délétés et remplacés par le gène d'intérêt. Les particules rétrovirales contenant l'ARN d'intérêt générées par les cellules d'encapsidation sont utilisées pour infecter des cellules cibles. La possibilité de produire des vecteurs dépourvus de rétrovirus recombinants infectieux et le fait qu'ils soient non immunogènes ont permis de réaliser des essais

thérapeutiques précoces (Caruso *et al.*, 1993). Cependant les limites d'utilisation de ce système de transfert résident notamment dans le fait qu'ils ne peuvent infecter que des cellules en phase de division, que l'obtention des quantités de virus recombinants nécessaires à des essais cliniques est difficile et coûteuse (Miller *et al.*, 1990). Mais la restriction principale à l'utilisation clinique de ces vecteurs est l'existence du risque de mutation insertionnelle, que l'on ne peut plus aujourd'hui nier (Woods *et al.*, 2003). Il est à noter qu'en 2003, tous les essais cliniques de thérapie génique utilisant des rétrovirus ont d'ailleurs été arrêtés (Brenner et Malech, 2003).

Depuis quelques années, on se tourne vers l'utilisation des lentivirus, une famille particulière de rétrovirus, en tant que vecteurs de gènes. Contrairement aux rétrovirus, les lentivirus, dont un représentant est le virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), sont capables d'infecter les cellules quiescentes (Kafri *et al.*, 1997). Les vecteurs lentiviraux développés ces dernières années sont pour la majorité dérivés du virus HIV-1. Le point critique à leur développement réside dans la mise au point d'un vecteur qui ne possède pas les caractéristiques pathogènes du lentivirus et ne peut générer de virus recombinant tout en conservant ses capacités de transfection et d'intégration dans le génome des cellules quiescentes. Les améliorations de ces vecteurs se font par étapes. On est parvenu à créer des vecteurs dont les risques de recombinaisons sont limités mais que l'on ne parvient pas à produire en quantité importante (Gasmi *et al.*, 1999).

I – 2 – 1 – 3. Vecteurs adénoviraux

Les adénovirus sont des virus à ADN double brin. Contrairement aux rétrovirus, les adénovirus peuvent infecter des cellules qui ne se répliquent pas. Le génome des adénovirus est complexe, même s'il ne comporte que deux régions codantes. Grâce à un système

d'épissage alternatif, ces régions codent pour des protéines exprimées de façon soit précoce soit tardive au cours du cycle de réplication viral. Le matériel génétique est contenu dans une structure protéique, la capsid. Les vecteurs adénoviraux sont capables d'infecter de nombreux types cellulaires, qu'il s'agisse de cellules quiescentes ou mitotiques (Ragot *et al.*, 1993). L'internalisation du virus dans la cellule cible résulte de l'interaction de protéines de la capsid avec des intégrines de la membrane cellulaire permettant l'endocytose des particules dans la cellule. L'ADN est libéré à proximité du noyau, lors de la destruction de l'endosome mais ne s'intègre pas dans le génome de la cellule, il reste en position épisomale. L'expression du transgène est transitoire et cette particularité peut s'avérer être à la fois un avantage et un inconvénient. La taille maximale du transgène est réduite, de 7 à 8 Kb, ce qui est un obstacle à l'utilisation de ces vecteurs dans des applications de thérapie génique.

Dans les premières générations de vecteurs adénoviraux, les virus sont délétés uniquement de leurs gènes précoces. Ces vecteurs provoquent une forte réponse immunitaire en partie due à l'expression des protéines des adénovirus et des particules virales elles-mêmes (Mah *et al.*, 2002). Dans les vecteurs adénoviraux plus récents toute la séquence codante est délétée, seules les ITR (Inversed Terminal Repeat) sont conservées (Green et Seymour, 2002). Ces vecteurs sont moins immunogéniques et permettent de maintenir une expression plus longue du transgène.

Depuis quelques temps des études s'orientent vers la mise au point de « vecteurs hybrides » adénovirus-rétrovirus (Bilbao *et al.*, 1997). Le but de tels vecteurs est de dépasser les limitations liées à chaque vecteur (transfection transitoire de l'adénovirus et infection de cellules en division pour les rétrovirus) tout en combinant leurs avantages : production de titres viraux élevés des adénovirus, intégration dans le génome de la cellule infectée.

I – 2 – 1 – 4. « Adeno Associated Virus » (AAV)

Le génome de ces virus est constitué par un simple brin d'ADN d'environ 5 Kb dont l'organisation génétique est simple puisqu'elle ne comporte que deux cadres de lecture et deux séquences inversées répétées (ITR). L'utilisation de ce type de vecteur est rendue possible par la délétion de séquences impliquées dans le processus de réplication (Vincent *et al.*, 1997). La production de vecteurs AAV recombinants est obtenue en cotransfectant, dans une cellule préalablement infectée par un adénovirus, le plasmide vecteur du gène d'intérêt et un plasmide apportant les séquences manquantes. Cette technique de transfert permet d'obtenir un fort pourcentage d'infection même sur des cellules ne se divisant pas. La spécificité de l'intégration des AAV dans le génome de la cellule cible au niveau du chromosome 19 rapportée par plusieurs équipes ne semble cependant pas être systématique (Samulski *et al.*, 1991 ; Huser *et al.*, 2002).

La non pathogénicité de ces vecteurs est un autre argument en faveur de leur utilisation pour les essais de thérapie génique humaine. L'évolution des méthodes de purification permet maintenant d'obtenir de grandes quantités de vecteurs dépourvus de contamination par les virus helper. Cependant la limite majeure au développement de ce vecteur reste la taille réduite de la cassette d'expression qui est de 4,5 Kb.

I – 2 – 2. Vecteurs de transfert non viraux

Les virus en tant que vecteurs de gènes ont de grands avantages. Ils permettent d'obtenir un taux de transfection élevé des cellules cibles mais des risques subsistent quant à la sécurité de leur utilisation. En parallèle des vecteurs viraux, les techniques de transfert non virales se développent ; elles doivent posséder les caractéristiques avantageuses des vecteurs viraux (taux de transfection élevé) tout en éliminant leurs limitations (taille du transgène, réaction immunitaire, risques d'insertion mutationnelle).

De nombreuses méthodes de transfert de gène non virales ont été décrites et testées, allant de la transfection par de l'ADN nu à celle utilisant des vecteurs lipidiques synthétiques. Ces derniers sont de plus en plus utilisés dans des essais de thérapie génique car ils représentent une alternative intéressante à l'usage des virus puisqu'ils ne font pas l'objet de recombinaisons génétiques et possèdent une relativement bonne efficacité de transfection. De plus ils sont plus simples à produire que les vecteurs viraux. Cependant l'inconvénient principal des liposomes est qu'ils ne permettent qu'un ciblage tissulaire limité après administration par voie intraveineuse. Les caractéristiques et limitations de quelques techniques de transfert non virales sont présentées dans le tableau B2.

	ADN nu	Electroporation	Liposomes
Mode d'expression	Transitoire	Stable	Transitoire
Immunogénéicité	Non	Non	Faible
Intégration dans le génome	Non	Non	Non
Avantages	pas de clonage de l'ADN dans un vecteur particulier	Transfection des cellules quiescentes, pas de clonage de l'ADN dans un vecteur particulier	Facilité de production, Pas de limitation à la taille de l'ADN Bonne efficacité de transfection
Limites	Efficacité de transfection limitée	Efficace dans certains tissus	Ciblage tissulaire

Tableau B2 : caractéristiques des principaux vecteurs non viraux utilisés dans les essais de thérapie génique.

Nous n'évoquons ici que les méthodes de transfert de gènes les plus utilisées pour les essais de thérapie génique *in vivo*. Une attention plus particulière sera portée aux vecteurs lipidiques, méthode de transfert de gène utilisée dans notre travail qui nous paraît d'avenir.

I – 2 – 2 – 1. ADN nu

Dans ce système, de l'ADN sous forme plasmidique est directement injecté dans le tissu. Le plasmide peut atteindre le noyau de la cellule où il est transcrit et permet une expression transitoire de la protéine d'intérêt, l'ADN restant sous forme épisomale (Davis *et al.*, 1993). Cependant les cellules musculaires semblent être les seules capables d'absorber et d'exprimer efficacement l'ADN plasmidique (Wolff *et al.*, 1992). Cette technique ne semble pas suffisante pour corriger des anomalies génétiques mais peut s'avérer efficace lors d'une procédure de vaccination puisqu'un faible taux d'expression du transgène est suffisant pour déclencher une réponse immunitaire (Zhu *et al.*, 1993). Ceci ouvre la voie à une nouvelle stratégie d'immunisation par administration d'ADN nu, d'autant plus que présence des séquences CpG non méthylées au niveau de l'ADN produit par des bactéries est immunogène (Cheng *et al.*, 2002 ; Krieg *et al.*, 1995).

I – 2 – 2 – 2. Electroporation

Elle permet l'introduction de gènes dans les cellules sous l'influence d'une brève décharge électrique (Kaplan et Delpech, 1992). L'application d'un champ électrique à haute tension au niveau de cellules en culture provoque l'ouverture transitoire de pores dans la membrane cellulaire et crée une force électrophorétique qui permet à l'ADN chargé négativement d'entrer dans la cellule. Cette technique de transfert est utilisée avec succès depuis longtemps *in vitro* pour transfecter aussi bien des cellules eucaryotes que procaryotes,

et ce n'est que très récemment que l'électroporation a été utilisée pour améliorer l'efficacité de transfert d'ADN nu *in vivo* (Wong *et al.*, 1982 ; Titomirov *et al.*, 1991).

Appliquée *in vivo*, cette technique présente certains avantages par rapport aux vecteurs viraux. Elle permet de transférer des cellules quiescentes et ne nécessite pas le clonage de l'ADN dans un vecteur particulier et est d'utilisation simple.

L'application *in vivo* de l'électroporation n'en est qu'à son début, mais les résultats obtenus par certaines équipes semblent prometteurs. En effet, lors d'essais réalisés chez l'animal mais aussi chez l'homme, un transfert de gènes par électroporation a été réalisé avec une bonne efficacité dans divers tissus, tels que la peau, le cerveau, le muscle ou le cartilage (Rols *et al.*, 1998 ; Inoue et Krumlauf, 2001 ; Mir *et al.*, 1999 ; Grossin *et al.*, 2003). Le résultat le plus intéressant a été obtenu lors de l'électroporation du tissu musculaire où une expression stable et de haut niveau du transgène a pu être mise en évidence même si le gène reste en position épisomale (Mir *et al.*, 1999). Si cette application ouvre de nouvelles perspectives pour la thérapie génique ou les vaccins à ADN, les protocoles appliqués doivent encore être optimisés et adaptés au type de tissu cible.

I – 2 – 2 – 3. Liposomes

Les méthodes de transfert basées sur l'utilisation de l'ADN nu présentent des limites. Dans l'organisme, l'ADN plasmidique est soumis à une dégradation rapide par action des nucléases endogènes. Par ailleurs une macromolécule polyanionique telle qu'un plasmide ne peut franchir facilement une membrane lipidique car les têtes polaires des lipides sont globalement neutres ou négativement chargés. Une neutralisation des charges négatives portées par l'ADN est nécessaire pour qu'il puisse passer la barrière lipidique. Tenant compte de ces considérations et des risques liés à l'emploi des virus en thérapie génique humaine, des vecteurs de transfert synthétiques ont été mis au point et connaissent un grand essor. Un

vecteur de transfert synthétique doit protéger le plasmide de l'action des nucléases endogènes, permettre une compaction de l'ADN et une neutralisation de sa charge négative pour lui faciliter le passage de la membrane cytoplasmique. Les liposomes vecteurs formés à partir de lipides synthétiques remplissent ces conditions (Felgner *et al.*, 1987 ; Felgner, 1995).

Les liposomes se présentent comme des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches de phospholipides possédant un compartiment aqueux. Les liposomes ne trouvent pas leur utilité que dans la thérapie génique. Ils peuvent aussi contenir dans leur compartiment aqueux ou dans leurs membranes lipidiques des molécules autres que l'ADN telles que des composés pharmacologiques, des protéines (Mayer *et al.*, 1989 ; Lee et Low, 1995 ; Kunstfeld *et al.*, 2003). Le principe de transfert de gène par les liposomes repose sur la condensation de l'ADN dans ces sphères. A l'inverse des méthodes de transfert virales, l'utilisation des liposomes pour délivrer des molécules d'ADN n'impose pas de limite de taille de ce dernier. Différents types de liposomes ont été créés et leur capacité de transfection évaluée. D'une manière générale les liposomes composés de lipides neutres ou anioniques ont une efficacité de transfection moindre *in vivo* même s'ils se révèlent être de bons vecteurs d'ADN *in vitro* (Soriano *et al.*, 1983 ; Nicolau et Papahadjopoulos, 1998). Les liposomes cationiques sont plus employés *in vivo* que les autres formulations liposomales, nous allons évoquer plus en détail ces vecteurs.

I – 2 – 2 – 4. Liposomes cationiques

I – 2 – 2 – 4 – 1. Formation des complexes liposomes cationiques/ADN

Le développement de ce type de vecteurs, leur utilisation sans cesse grandissante par de nombreuses équipes de recherche, les différentes formulations de liposomes amènent une certaine complexité de dénomination. Pour une plus grande clarté, le terme de « lipoplexe » a

été choisi pour désigner un complexe formé par un lipide cationique et des acides nucléiques (Felgner *et al.*, 1997).

Le principe de formation de ces lipoplexes repose sur une condensation de l'ADN, chargé négativement sur les groupements phosphates, avec une molécule chargée positivement pour former de nouvelles particules (Figure B2). Les vecteurs lipidiques, constitués de trois domaines (une tête cationique permettant la liaison à l'ADN, une ou plusieurs chaînes hydrophobes, un « espaceur » séparant ces deux éléments) réagissent spontanément avec les molécules d'ADN chargées négativement (Nicolau et Papahadjopoulos, 1998). Les lipides entrant le plus souvent dans la composition des liposomes cationiques comprennent le DOGS (dioctadécylamidoglycyl-spermine ou transfectam), le DOTMA (bromure de dioléoyloxy-propyl-triméthylammonium) un ammonium quaternaire amphiphile, le DOTAP (dioléoyloxy-3-(triméthylammonio)propane). Des co-lipides tels que la DOPE (dioléoylphosphatidyléthanolamine) phospholipide neutre, le cholestérol et ses dérivés permettent de stabiliser les lipoplexes formés et d'atteindre de meilleur taux de transfection *in vivo* (Oudrhiri *et al.*, 1997 ; Kikuchi *et al.*, 1999). L'utilisation de polymères cationiques tels que la poly-L-lysine permet une meilleure condensation de l'ADN dans les liposomes et augmente l'efficacité du transfert de gènes (Liu *et al.*, 2001).

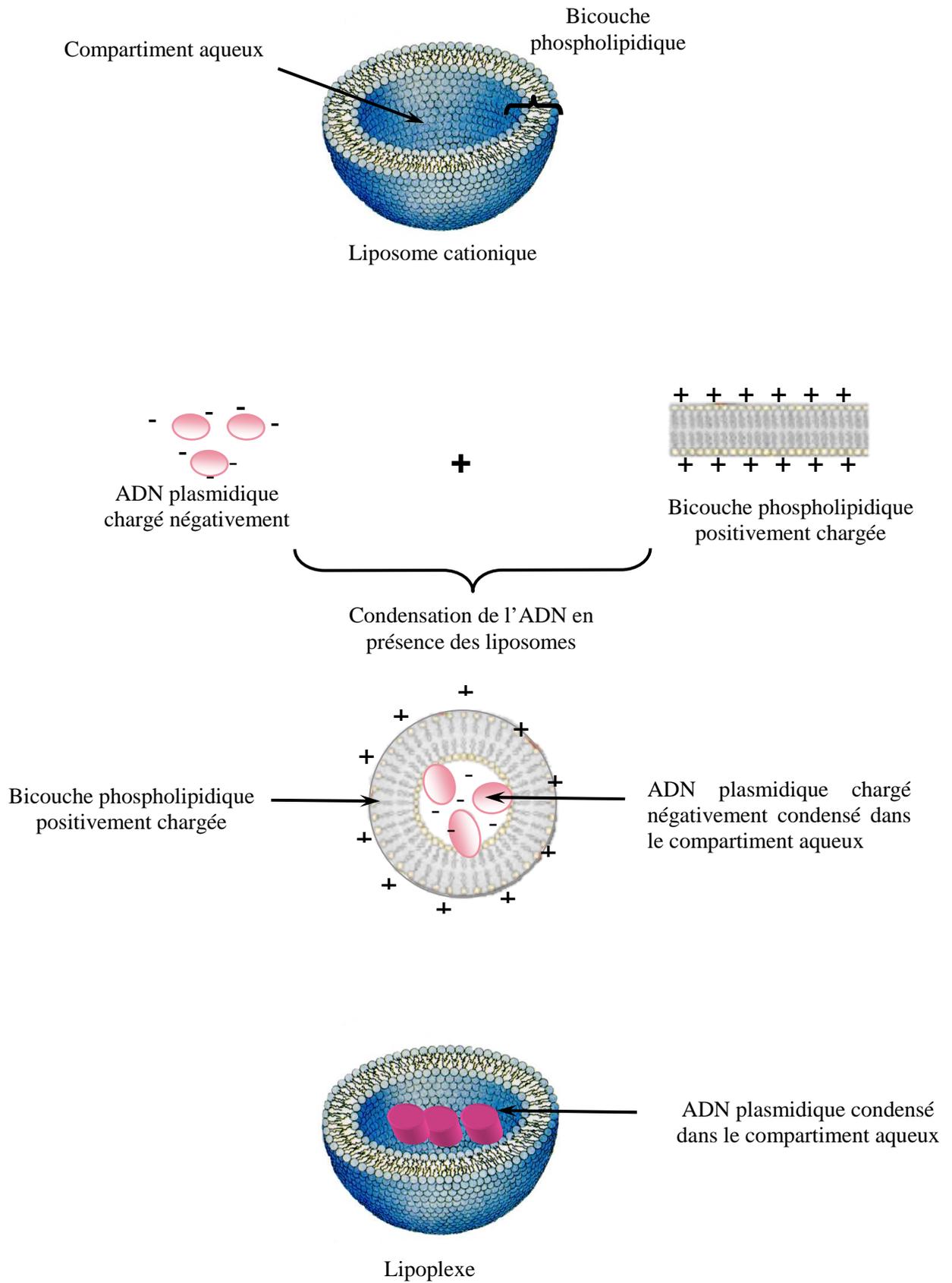


Figure B2 : Formation des lipoplexes.

I-2-2-4-2. Mécanisme de transfection

Le déroulement de la lipofection est représenté sur la Figure ci dessous :

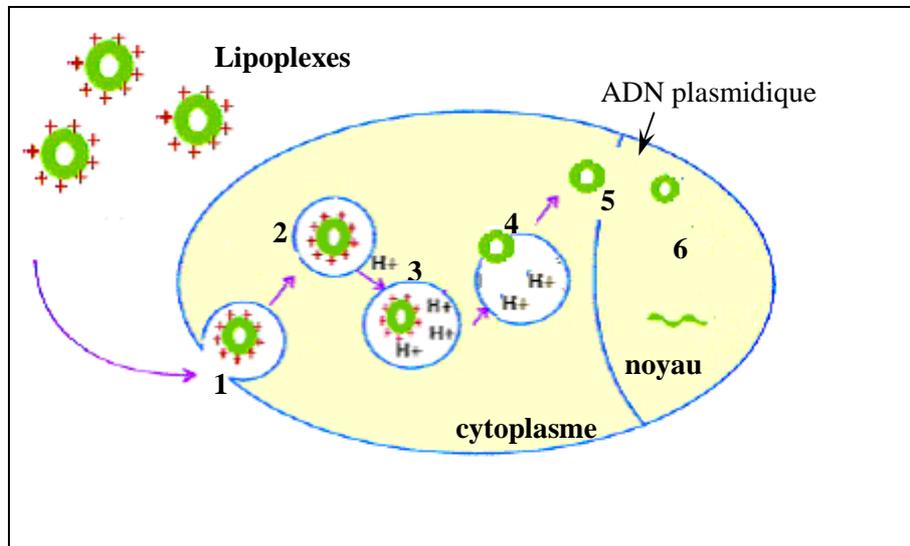


Figure B3 : Représentation schématique du mécanisme de transfert des lipoplexes dans la cellule. (D'après Vijayanathan *et al.*, 2002.)

- 1 : Endocytose des lipoplexes.
- 2 : Formation des endosomes
- 3 : Acidification du pH dans les endosomes, protection de l'ADN par les liposomes cationiques
- 4 : Relargage de l'ADN à proximité du noyau
- 5 : Translocation nucléaire de l'ADN plasmidique
- 6 : Décompaction de l'ADN plasmidique

Les charges positives réparties sur la surface des lipoplexes leur permettent de se lier aux protéoglycannes négativement chargés de la membrane cellulaire, les lipoplexes sont alors transportés dans la cellule par endocytose. L'accumulation des composés cationiques dans les endosomes protège l'ADN de la dégradation par les enzymes lysosomales déstabilise l'endosome et induit le relargage de l'ADN à proximité du compartiment nucléaire (Vijayanathan *et al.*, 2002). La translocation de l'ADN dans le noyau se fait via les pores

nucléaires. Dans le noyau, l'ADN se décondense et reste sous forme épisomale, ne permettant qu'une expression transitoire du transgène, dont la durée est dépendante du type de formulation utilisée (Wheeler *et al.*, 1996; Aksentijevich *et al.*, 1996). L'efficacité du transfert dépend de plusieurs paramètres dont le type de lipide utilisé : la condensation correcte de l'ADN dans les liposomes, le rapport ADN/lipide, le type cellulaire. Certaines cellules comme les fibroblastes humains se révèlent particulièrement difficiles à transfecter (Zhdanov *et al.*, 2002).

Une des raisons du développement des lipoplexes comme vecteur de transfert de gène repose sur leur efficacité et leur sécurité d'utilisation. Cependant, il a été établi que l'administration par voie intraveineuse de certains lipoplexes, est immunogène et peut activer le système du complément (Dow *et al.*, 1999). Cet effet apparaît plutôt lié à la présence d'ADN plasmidique dans le lipoplexe puisque aucune réponse immunologique n'est observée lors de l'utilisation d'un liposome cationique (Whitmore *et al.*, 1999 ; Norman *et al.*, 2000). Afin de réduire la cytotoxicité des liposomes, de nombreux lipides cationiques sont mis au point en utilisant des analogues du DOTMA, d'autres contiennent du cholestérol, des lipopolyamines (Zhdanov *et al.*, 2002).

I – 2 – 2 – 4 – 3. Liposomes cationiques et ciblage cellulaire

L'inconvénient majeur des liposomes est une faible sélectivité tissulaire. Certes la biodistribution des liposomes est différente suivant leur composition (Audouy *et al.*, 2002) et les liposomes cationiques ont une affinité particulière pour les cellules endothéliales et néoendothéliales. Ils vont cibler de préférence les néovaisseaux tumoraux ce qui est un avantage mais également les sites inflammatoires (Thurston *et al.*, 1998). Ce dernier élément est un désavantage dans l'application des thérapies géniques à but antiangiogénique, elles risquent alors d'interférer avec le processus naturel d'angiogenèse.

Les recherches se concentrent maintenant sur une amélioration du temps de circulation et de ciblage tissulaire des liposomes cationiques. En effet, les premières formulations de liposomes étaient rapidement dégradées dans le sang quelques minutes après l'injection (Reinish *et al.*, 1988). Dans des expériences récentes Krasnici a montré qu'une formulation liposomale possède une affinité particulière, 3,3 fois plus élevée, pour les néovaisseaux tumoraux par rapport au réseau vasculaire environnant (Krasnici *et al.*, 2003). L'addition de protéines telle que la transferrine améliore également le transfert du gène d'intérêt dans les vésicules d'endocytose.

Outre par une variation de la composition des liposomes, un ciblage tissu-spécifique peut être obtenu en « greffant » aux liposomes de molécules, d'anticorps ou des fragments d'anticorps permettant une reconnaissance spécifique de récepteurs uniquement exprimés ou surexprimés par les cellules cibles (Straubinger *et al.*, 1988; Ahmad *et al.*, 1993, Xu *et al.*, 2002). Généralement les cellules tumorales expriment des antigènes spécifiques qui peuvent servir de cibles pour les anticorps associés aux liposomes. Cette technique a permis de cibler avec un succès certaines tumeurs (Maruyama *et al.*, 1999; Brignole *et al.*, 2003) (Tableau B3).

Cependant une amélioration de la formulation des liposomes est encore nécessaire afin d'obtenir un ciblage parfait après administration par voie intraveineuse des liposomes.

Anticorps greffé aux liposomes	Ciblage tissulaire évalué	Référence
DH2 (Anti-G(M3))	<u>Modèle <i>in vitro</i></u> : - cellules de mélanome murin B16BL6 - cellules d'adénocarcinome colorectal humain HRT-18 <u>Modèle <i>in vivo</i></u> - Mélanome murin B16BL6	Nam <i>et al.</i> , 1999
Anti-GD(2)	<u>Modèle <i>in vitro</i></u> Cellules de neuroblastome <u>Modèle <i>in vivo</i></u> Neuroblastome humain métastatique greffé sur des souris nude	Brignole <i>et al.</i> , 2003
Fab'21B2 (Anti-CFA)	<u>Modèle <i>in vivo</i></u> Tumeur solide humaine	Maruyama <i>et al.</i> , 1999
Her-2	<u>Modèle <i>in vivo</i></u> Xénogreffes chez la souris nude de tumeurs : - MDA-MB 453 - MCF7/HER - BT 474	Park <i>et al.</i> , 2002
AF-20	<u>Modèle <i>in vitro</i></u> Cellules HCC (hépatocarcinome humain)	Moradpour <i>et al.</i> , 1995
scFv-Anti TfR	<u>Modèles <i>in vivo</i></u> - Cancer du sein greffé humain chez la souris nude - Cancer de la prostate humain greffé chez la souris nude	Xu <i>et al.</i> , 2001 Xu <i>et al.</i> , 2002

Tableau B3 : Exemples de ciblage tissulaire obtenu par greffage d'anticorps sur des liposomes.

TfR : Transferrin receptor

Nous venons de voir que des systèmes de transfert très différents ont été développés afin d'amener le transgène à la cellule cible, tous présentant des avantages et ont leurs propres limites. Le choix d'un système de vectorisation est lié au type de thérapie génique que l'on souhaite appliquer, et que nous allons maintenant évoquer.

Le tableau ci dessous résume les caractéristiques des principaux vecteurs que nous venons de développer

Méthode de transfert	Mode d'expression	Immunogénéicité	Efficacité de transfection <i>in vivo</i>	Essais cliniques
<u>Vecteurs viraux</u>				
AAV	Stable	?	++	4
Adénovirus	Transitoire	Elevée	+++	86
Herpesvirus	Transitoire	Modérée	?	-
Poxvirus	Transitoire	Modérée	?	30
Rétrovirus	Stable	Modérée	++	160
<u>Vecteurs non viraux</u>				
Micro-injection d'ADN	Transitoire	Aucune	+	4
Electroporation	Stable	Aucune	±	2
Liposomes	Transitoire	Aucune	++	75

Tableau B4 : Récapitulatif des principaux vecteurs utilisés pour des essais cliniques de thérapie génique.

I – 3. Stratégies de thérapie génique appliquées au traitement du cancer

Plusieurs types de maladies peuvent faire l'objet d'une thérapie génique, qu'il s'agisse de maladies génétiques classiques, dues à des défauts de gènes ou de maladies acquises telles que le cancer. La thérapie génique est une approche prometteuse pour le traitement du cancer et a montré une certaine efficacité, évaluée sur divers modèles tumoraux animaux. Plusieurs types de stratégies de thérapie génique à but anticancéreux sont possibles:

- l'utilisation du système gène suicide/prodrogue,
- la modification de la fonction des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur,
- la modification de la réponse immunitaire vis à vis de la tumeur,
- l'augmentation de la résistance des tissus sains vis à vis de la chimiothérapie,
- l'inhibition de la vascularisation tumorale.

I – 3 – 1. Gènes de sensibilité à une prodrogue ou gènes suicides

Une des applications de la thérapie génique est l'activation spécifique d'une prodrogue non toxique en drogue cytotoxique exclusivement à l'intérieur des cellules tumorales. Le principe de cette technique est de transférer *in vivo* dans les cellules tumorales un gène codant pour une enzyme qui est normalement absente du patrimoine des cellules ou très faiblement exprimée. Cette enzyme a la capacité de transformer un produit non toxique en un métabolite toxique pour la cellule dans laquelle il est produit.

Plusieurs systèmes enzyme/prodrogue ont été décrits au cours des dix dernières années, parmi lesquels deux associations sont plus particulièrement étudiées ; les principaux essais ont été réalisés en utilisant soit l'association cytosine désaminase-5 fluorocytosine (CD-5-FC), soit l'ADN complémentaire codant pour la thymidine kinase issue du virus de l'*Herpes simplex* de type-1 associé à la prodrogue gancyclovir (GCV) (Moolten, 1986 ; Kim

et al., 2002). Dans le système HSV-TK/GCV (*Herpes simplex Virus* Thymidine Kinase/Gancyclovir), le gancyclovir est transformé en gancyclovir triphosphate par la thymidine kinase, déclenchant une cascade réactionnelle dont l'aboutissement est la mort de la cellule par apoptose.

Le mécanisme d'action des gènes suicides est schématisé sur la Figure B4.

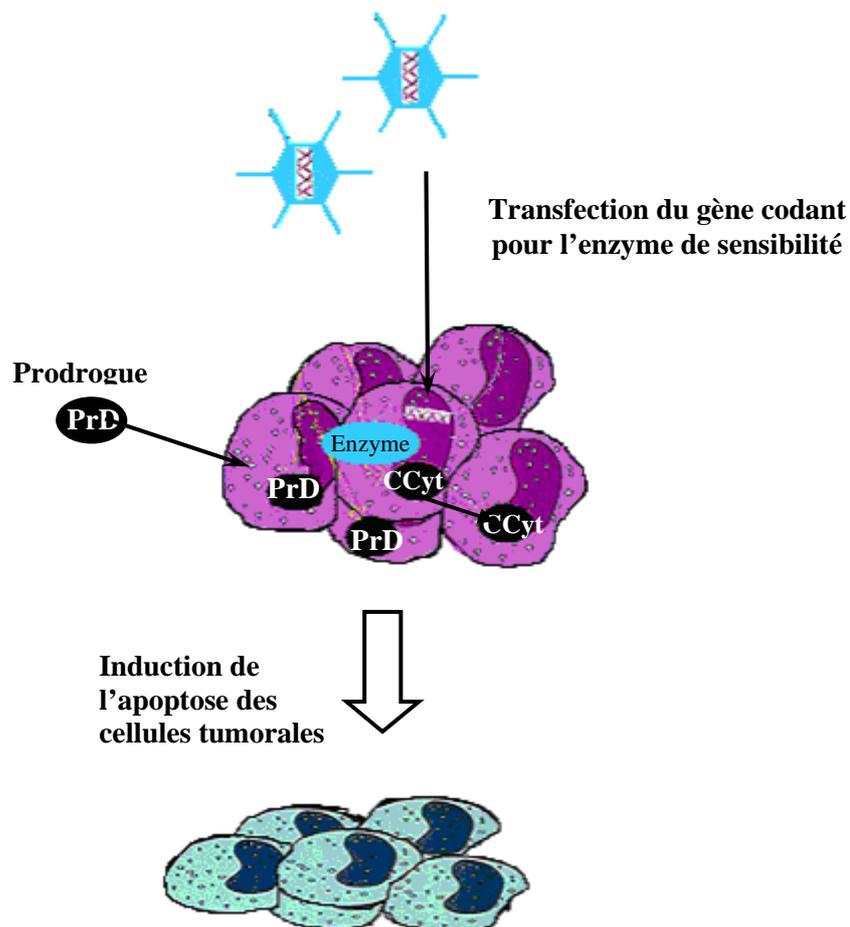


Figure B4 : Schéma du mécanisme d'action du système gène suicide/prodrogue (d'après Springer et Niculescu-Duvaz, 2000).

Le système se déroule en deux étapes : le gène de sensibilité à la prodrogue est transféré, et dans un second temps, la prodrogue (PrD) est administrée. La prodrogue est transformée en composé cytotoxique (CCyt) uniquement dans les cellules exprimant le gène de sensibilité. Le composé cytotoxique peut diffuser dans les cellules proches non transfectées (effet bystander). Les cellules tumorales meurent par apoptose

Ce système ne nécessite pas une transfection à 100% des cellules tumorales pour être totalement efficace. En effet, une des caractéristique majeure commune à l'ensemble de ces gènes de sensibilité est qu'ils possèdent tous un effet « bystander » ou de voisinage observable aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Hoganson *et al.*, 1996). Cet effet « bystander » permet la destruction des cellules tumorales non transfectées situées à proximité des cellules exprimant le gène de sensibilité. L'efficacité de cette stratégie est évaluée sur divers modèles de cancer aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Caruso *et al.*, 1993, Grossin *et al.*, 1999 ; Charissoux *et al.*, 1999 ; Hurwitz *et al.*, 1999).

Des essais cliniques, basés sur l'utilisation du système HSV-TK/GCV, ont été mis en place et ont tous montré une bonne tolérance au traitement puisqu'aucun effet secondaire néfaste n'a été observé. Les résultats obtenus, en terme d'efficacité antitumorale, sont variables selon le type tumoral ciblés ; ils semblent prometteurs concernant le gliome, le rétinoblastome ou l'utilisation du système HSV-TK/GCV dans le contrôle de la réponse immunitaire après une greffe de cellules de moelle osseuse allogéniques (Klatzmann *et al.*, 1998 ; Tiberghien *et al.*, 1997).

Parmi les nouvelles approches évaluées et utilisant les gènes de sensibilité, l'association des thérapeutiques classiques (chimiothérapie ou radiothérapie) à la thérapie génique utilisant ces gènes paraît très prometteuse pour augmenter l'efficacité des gènes suicides (Beltinger et Uckert, 2001 ; Yazawa *et al.*, 2002). De même, le couplage du gène de sensibilité à un gène codant pour une cytokine est intéressant et permet d'obtenir une régression tumorale plus importante que lors de l'utilisation d'un seul des deux gènes (Moriuchi *et al.*, 1998).

I – 3 – 2. Modification de la fonction des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur

Une cellule cancéreuse est caractérisée par l'accumulation de mutations sur des gènes clés du fonctionnement cellulaire (oncogènes, anti-oncogènes). Elle se prête bien à une correction de ses propriétés anormales par transfert de gène visant à restaurer l'activité de ces gènes mutés. Les cibles exploitées sont les oncogènes et les antioncogènes ou gènes suppresseurs de tumeur.

I – 3 – 2 – 1. Inhibition de l'expression des oncogènes

La stratégie à envisager dans ce cas consiste à bloquer l'expression des oncogènes en utilisant des oligonucléotides qui vont soit s'intercaler sur le gène et former une triple hélice entraînant le blocage transcriptionnel, soit agir au niveau traductionnel en s'appariant avec l'ARN messager (Mergny *et al.*, 1992). L'oncogène K-*ras* très fréquemment muté dans les cancers humains a été choisi comme cible pour les premiers essais thérapeutiques. Des essais chez l'animal ont démontré une régression de certaines tumeurs, notamment en utilisant un vecteur rétroviral codant pour un ARN messager antisens du gène K-*ras* (Zhang *et al.*, 1993). Les autres oncogènes activés dans les tumeurs humaines peuvent être l'objet d'une telle approche.

I – 3 – 2 – 2. Rétablissement des gènes suppresseurs de tumeur

Le transfert de l'anti-oncogène fonctionnel permet d'inverser le phénotype transformé de la cellule. La fonction de tous les anti-oncogènes (Retinoblastoma Rb, Adenomatous Polyposis Coli (APC) peut être théoriquement restaurée. L'anti-oncogène p53, dont la fonction est la plus fréquemment défailante dans les cancers humains, a fait l'objet de premiers travaux. Sur des modèles murins, il a été démontré, *in vitro* et *in vivo*, que le transfert de la forme normale de p53 et son expression dans les cellules présentant des

mutations de p 53 endogène permet de ralentir leur prolifération et rétablit l'apoptose des cellules anormales (Baker *et al.*, 1990). Le premier essai clinique de restauration du gène p53 a été mené en 1995 par Roth chez 9 patients atteints de carcinome pulmonaire non résecable (Roth *et al.*, 1995). La limite principale de cette stratégie d'inhibition des oncogènes ou de rétablissement de la fonction des antioncogènes est la nécessité de traiter toutes les cellules de la tumeur, ce qui est à l'heure actuelle encore impossible. La possibilité qu'une telle stratégie conduise à la sélection de sous populations de cellules tumorales mutantes et donc résistantes à la thérapie n'est pas non plus à oublier.

I – 3 – 3. Immunothérapie

L'immunothérapie génique du cancer vise à induire ou à amplifier la réponse immunitaire de l'hôte contre les cellules cancéreuses. Deux approches sont envisageables: stimuler *in vivo* le développement d'une immunité protectrice par transfert de gènes dans les cellules tumorales ou dans des cellules présentatrices d'antigène (immunothérapie génique active), ou encore apporter au patient des cellules effectrices, les lymphocytes T, modifiées *in vitro* (immunothérapie génique adoptive). La majorité des protocoles d'immunothérapie génique, engagés dans le domaine de l'oncologie, concerne l'immunothérapie active.

I – 3 – 3 – 1. Immunothérapie adoptive

L'objectif de cette stratégie est d'augmenter la réponse immunitaire en apportant des effecteurs cellulaires antitumoraux (lymphocytes T) génétiquement modifiés afin d'augmenter leur efficacité cytotoxique. Elle concerne les lymphocytes T infiltrants les tumeurs (TIL), et les lymphocytes T cytotoxiques. Dans le but d'augmenter leur potentiel antitumoral, les lymphocytes sont modifiés par transfert de gènes codant pour des récepteurs d'antigènes tumoraux (Rosenberg *et al.*, 1988). Cette stratégie a été améliorée par la création lymphocytes

T-EBV (Ebstein Barr Virus) et exprimant des récepteurs chimériques spécifiques d'antigènes tumoraux ou pour des agents tel que le TGF β (Finney *et al.*, 1997 ; Rossig *et al.*, 2002, Rooney *et al.*, 1998 ; Bollard *et al.*, 2002).

I – 3 – 3 – 2. Immunothérapie active

L'immunothérapie active consiste à administrer des cellules génétiquement modifiées, qu'elles soient tumorales ou présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques), dont la fonction est de recruter ou de stimuler des effecteurs immuns antitumoraux (Biagi *et al.*, 2002).

L'injection de cellules tumorales génétiquement modifiées a pour but de détruire les cellules tumorales non modifiées en induisant ou en stimulant une réponse immunitaire antitumorale. L'augmentation de l'immunogénicité des tumeurs induit une protection antitumorale chez l'animal. Dans des modèles animaux, la transfection des cellules tumorales par les gènes de différentes cytokines, l'IL-2, l'IL-12, l'interféron gamma (IFN γ), le GM-CSF diminue le potentiel de croissance, voire entraîne l'élimination de ces cellules transfectées (Schmidt *et al.*, 1997 ; Trinchieri, 1993 ; Dranoff *et al.*, 1993). Il a été mis en évidence que cet effet était effectivement médié par un mécanisme immunologique (Asher *et al.*, 1991 ; Zitvogel *et al.*, 1995). Parmi tous ces résultats, ceux avec le GM-CSF sont les plus performants pour induire une réponse immunitaire thérapeutique (Dranoff *et al.*, 1993).

Plus récemment, l'utilisation de cellules présentatrices d'antigènes, les cellules dendritiques, a été évaluée dans différents protocoles d'immunothérapie génique active. La fonction principale de ces cellules est de capter des antigènes et de les présenter aux cellules effectrices du système immunitaire activant ainsi les lymphocytes T naïfs. Les cellules dendritiques peuvent être la cible d'un transfert de gène codant soit pour des cytokines ou

pour des molécules de costimulation (Wysocki *et al.*, 2002). L'utilisation d'ARN tumoraux pour transfecter ces cellule est une stratégie efficace pour induire une réponse immune antitumorale chez l'animal (Boczkowski *et al.*, 1996 ; Nair *et al.*, 2000). Un essai clinique vient récemment de montrer qu'une façon efficace d'obtenir l'expression endogène d'antigènes de tumeurs par les cellules dendritiques c'est de les fusionner avec les cellules tumorales. (Catros-Quemener *et al.*, 2003).

I – 3 – 4. Augmentation de la résistance des tissus sains vis à vis de la chimiothérapie

Cette stratégie se justifie parce que les cellules tumorales deviennent chimiorésistances au fur et à mesure des traitements et qu'une augmentation des doses de chimiothérapie est une des façons de dépasser cette chimiorésistance. Mais les doses de chimiothérapie utilisables sont limitées par la toxicité vis-à-vis des tissus sains, principalement vis à vis du tissu hématopoïétique. Rendre les cellules normales insensibles à la chimiothérapie permettrait d'utiliser cette dernière au maximum des doses ou rythmes d'administration. La cible de la thérapie génique est alors le tissu que l'on souhaite protéger, pour l'instant seul le tissu hématopoïétique est concerné. Le transfert dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH) du gène « Multidrug Resistance » (MDR1) codant pour la glycoprotéine P (Pgp), une protéine transmembranaire participant à l'efflux des substances toxiques hors de la cellule, induit une protection de ces cellules vis à vis des agents chimiothérapeutiques (Aksentijevich *et al.*, 1996). Cependant ce type de stratégie ne peut s'appliquer à toutes les formes de cancer puisque dans bon nombre de cas, une résistance aux poly-chimiothérapies est observée chez les malades, induisant une inefficacité du traitement.

I – 3 – 5. Thérapie génique antiangiogénique.

L'angiogenèse, qui correspond à l'ensemble des processus amenant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est indispensable à la croissance tumorale (Folkman, 1990). La dépendance de la tumeur vis à vis de ce processus en fait une cible de choix pour les thérapies anticancéreuses, d'autant plus que les cellules cibles ne sont plus les cellules tumorales mais les cellules endothéliales formant les vaisseaux. Les meilleures connaissances des mécanismes complexes de l'angiogenèse, mais surtout la mise en évidence d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse ouvrent la voie à la thérapie génique antiangiogénique (Fan *et al.*, 1995). L'utilisation de la thérapie génique dans la lutte contre l'angiogenèse peut s'envisager de deux manières : par inhibition des phénomènes pro-angiogéniques ou par stimulation des mécanismes d'inhibition de l'angiogenèse. Cette approche de thérapie génique est plus longuement évoquée dans le chapitre consacré aux stratégies antiangiogéniques.

Les approches de thérapies géniques à but anticancéreux sont multiples, chacune ayant ses avantages et ses inconvénients. La variété des vecteurs de transfert de gènes et la diversité des approches de thérapie génique permettent de choisir à la fois le vecteur et la stratégie de thérapie génique qui paraissent le plus adaptés pour le traitement d'une tumeur donnée. Les stratégies de thérapies géniques peuvent présenter une alternative aux traitements conventionnels, particulièrement pour les tumeurs comme l'ostéosarcome qui répondent peu ou mal à ces traitements.

II. Ostéosarcome

II – 1. Définition

L'ostéosarcome est une tumeur osseuse maligne dont les cellules produisent de la matrice osseuse ou ostéoïde. Il existe de nombreuses variétés d'ostéosarcome classées selon des critères histologiques : on distingue l'ostéosarcome classique, télangiectasique, à petites cellules, central, juxtacortical, secondaire (Schajowicz *et al.*, 1995). Dans sa forme secondaire, l'ostéosarcome survient à la suite de la maladie de Paget ou chez des enfants ayant développé un rétinoblastome en bas âge (Schimke *et al.*, 1974). Cette forme tumorale secondaire ne sera pas évoquée ici, nous allons uniquement présenter l'ostéosarcome primaire classique.

Chez l'homme, l'ostéosarcome primaire dont l'étiologie reste encore inconnue, ne représente que 0,2% de toutes les néoplasies malignes, soit 5% des cancers de l'enfant (Philip *et al.*, 1999 ; Cancer.gov, juillet 2003). Il affecte essentiellement les adolescents ou les jeunes adultes (Campanacci *et al.*, 1975 ; Dahlin *et al.*, 1986). Classiquement, la tumeur primaire est le plus souvent située sur la métaphyse des os longs ; la partie distale du fémur, proximale du tibia et de l'humérus sont ses principaux sites de localisation. L'ostéosarcome est caractérisé par une évolution rapide et métastase préférentiellement au niveau des poumons.

II – 2. Diagnostic

II – 2 – 1. Présentation clinique

Le symptôme initial le plus fréquent de l'ostéosarcome est une douleur ou la présence d'une tuméfaction au niveau d'un os ou d'une articulation (Arndt et Crist, 1999).

Outre l'examen clinique, le diagnostic de l'ostéosarcome repose sur l'imagerie médicale et l'examen anatomopathologique d'une biopsie.

II – 2 – 2. Imagerie médicale

II – 2 – 2 – 1. Radiologie

La radiographie permet de confirmer l'existence de la lésion osseuse. L'aspect typique radiographique d'un ostéosarcome montre des limites de la lésion plus ou moins nettes et entourées d'une ostéocondensation, de même qu'une destruction de la corticale, et un envahissement des tissus et articulations avoisinants (Rosenberg *et al.*, 1995).

II – 2 – 2 – 2. Imagerie médicale

Deux principales techniques d'imagerie autres que la radiographie sont utilisées dans le diagnostic de l'ostéosarcome : l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la scintigraphie osseuse. Elles permettent d'étudier l'extension locale de la tumeur et occupent une place prépondérante dans la recherche des métastases. Cette recherche des métastases est primordiale car lors du diagnostic de la tumeur primaire 20% des patients présentent déjà des foyers métastatiques localisés dans 80% des cas au niveau des poumons (Kaste *et al.*, 1999).

L'IRM permet une étude morphologique de la tumeur primaire et des structures adjacentes ; elle précise les rapports exacts de la tumeur avec les organes de voisinage, muscles, vaisseaux et nerfs, ainsi que son étendue (Van Trommel *et al.*, 1997).

La scintigraphie osseuse aux diphosphonates marqués au technétium ($^{99m}\text{Tc-MDP}$) est l'examen radio-isotopique classique dans l'étude de la pathologie osseuse. La fixation osseuse du MDP est proportionnelle au flux vasculaire et à l'activité ostéométabolique locale (Philip

et al., 1999). L'examen scintigraphique permet d'étudier la vitalité cellulaire locale et de rechercher des métastases osseuses (Caluser *et al.*, 1994).

A l'heure actuelle une autre technique de scintigraphie qui apparaît plus efficace dans le diagnostic et le suivi de l'ostéosarcome est en cours d'évaluation clinique : la scintigraphie au ^{18}F FDG (Brenner *et al.*, 2003). Le fluorodésoxyglucose marqué au fluor 18 (^{18}F]-fluoro-2-déoxy-D-glucose ou ^{18}F FDG) est un traceur biologique aspécifique dont la fixation est accrue dans les conditions pathologiques comportant une augmentation de la consommation de glucose ce qui est le cas pour les tumeurs (Warburg, 1956). Cette technique d'imagerie est basée sur la différence de consommation de glucose entre les tissus sains et tumoraux. Le ^{18}F FDG est un radionucléide émetteur de positon, analogue du glucose de demie vie courte (109 min). Après injection intraveineuse, ce glucose modifié est capté de façon analogue au glucose par les cellules consommatrices. Dans la cellule, le ^{18}F FDG transformé en ^{18}F FDG -6 phosphate est incapable de passer la membrane cellulaire. Il ne subit pas les autres étapes de la glycolyse et s'accumule dans les cellules. Le ^{18}F FDG permet d'effectuer une imagerie du métabolisme glucidique. Une grande variété de cancers montre un rapport de fixation de ^{18}F FDG élevé par rapport au reste de l'organisme (Som *et al.*, 1980). L'augmentation du métabolisme glucidique par les cellules tumorales résulte de l'augmentation du nombre de transporteurs du glucose (par surexpression des gènes codants ces transporteurs) et de l'amplification des voies enzymatiques de la glycolyse.

Cette technique d'imagerie fonctionnelle et métabolique, a l'avantage de permettre le suivi de l'évolution tumorale *in vivo*. Elle est la plus sensible et la plus précoce pour évaluer la réponse thérapeutique car les modifications morphologiques de la tumeur apparaissent après les modifications métaboliques. De plus, la grande résolutivité de cette méthode

d'imagerie permet de visualiser des foyers métastatiques qui n'apparaissent pas en utilisant d'autres méthodes de détection.

II – 2 – 3. Anatomopathologie de l'ostéosarcome

Les examens biologiques sont le plus souvent normaux en dehors d'une augmentation des PHA (phosphatases alcalines sériques) traduisant un remaniement osseux. La biopsie est obligatoire et reste essentielle dans le diagnostic de l'ostéosarcome et pour le distinguer d'autres tumeurs osseuses (telles que le sarcome d'Ewing, l'ostéochondrome).

Histologiquement, la lésion apparaît comme une prolifération d'ostéoblastes plus ou moins bien différenciés, produisant une matrice osseuse d'architecture anarchique, plus ou moins abondante. Cette matrice osseuse peut être isolée, ou associée à une production de matrice cartilagineuse, ou fibreuse (Schajowicz *et al.*, 1995). Il existe un désordre architectural du tissu néoformé qui de plus s'infiltré dans les espaces médullaires de l'os qui abrite la tumeur, envahissant ses travées. Les vaisseaux de l'ostéosarcome sont souvent des sinusoides ou de véritables cavités caverneuses sans paroi propre bien formée.

II – 3. Traitement conventionnel de l'ostéosarcome

Avant l'avènement de la chimiothérapie dans les années 1970, le traitement de l'ostéosarcome consistait principalement en une résection chirurgicale de la tumeur ou en une amputation du membre atteint. Le taux de survie à 5 ans était alors faible, de l'ordre de 10 à 20 % (Eilber et Rosen, 1989). Les progrès réalisés dans le domaine de la chirurgie mais surtout le développement de la chimiothérapies pré- et post-opératoire ont permis d'allonger le délai de survie et de guérir au moins 2/3 des patients (Ferguson et Goorin, 2001).

Mise en place à partir de 1978, la chimiothérapie a métamorphosé le traitement de l'ostéosarcome et a permis d'envisager des techniques chirurgicales plus conservatrices que l'amputation (Rosen, 1985).

A l'inverse de la chimiothérapie, dont l'usage s'est développé, les autres traitements complémentaires proposés, en particulier la radiothérapie de la tumeur primitive, ou l'irradiation prophylactique des poumons se révèlent peu efficaces (Ferguson et Goorin, 2001).

Le traitement actuel de l'ostéosarcome comprend une résection chirurgicale de la tumeur associée à de la chimiothérapie généralement pré- et post-opératoire. En effet, les protocoles associant une chimiothérapie néoadjuvante à une chimiothérapie adjuvante ont une efficacité supérieure aux protocoles de chimiothérapie adjuvante seule (Philip *et al.*, 1999). Le traitement chimiothérapeutique s'effectue sur plusieurs mois. En règle générale, deux à trois mois de traitement sont réalisés avant la résection chirurgicale de la tumeur. En cas de bonne réponse à la chimiothérapie préopératoire, la chimiothérapie post opératoire est inchangée ; si la réponse est jugée mauvaise, d'autres agents sont utilisés.

La sensibilité de la tumeur à la chimiothérapie employée est déterminée par l'appréciation du pourcentage de nécrose de la tumeur. Une tumeur est considérée comme « bon répondeur » à un traitement néoadjuvant lorsque 90 à 95 % de nécrose sont observés au terme de la chimiothérapie préopératoire (Ferguson et Goorin, 2001).

Les agents chimiothérapeutiques utilisés dans le traitement de l'ostéosarcome peuvent être classés selon leur mécanisme d'action sur le cycle cellulaire. On distingue les alkylants, les antimétabolites, les alcaloïdes et les antibiotiques ou intercalants. Les médicaments les plus employés dans le traitement de l'ostéosarcome sont la doxorubicine, le méthotrexate à haute dose, le cis-dichloro-diamino-platinum (CIS-DDP ou CDDP), l'adriamycine (ADM)

(Ferguson et Goorin, 2001). Le tableau B5 présente les résultats de quelques protocoles appliqués au traitement de l'ostéosarcome et associant la chirurgie à la chimiothérapie.

	Protocole	Nombre de patients	Survie	Durée du suivi
<u>Rosen (1979)</u>	CT préopératoire VCR + MTX+ADR	51	à 4ans 77% sans récurrence à 4 ans 67%	4ans
<u>Goorin (1987)</u>	CT adjuvante postopératoire MTX HD + ADR	46	à 5 ans 78%, sans récurrence à 5 ans 59%	4,7 ans 1976-1981
<u>Jaffe (1991)</u>	CT préopératoire CDDP IA CDDP+ADR± Endoxan	60	sans récurrence 56 %	1980-1984 1985-1989
<u>Saeter (1991)</u>	CT préopératoire MTX HD 4 cures CT postopératoire MTX HD BR CDDP+ADR MR	97	à 5 ans 64% sans récurrence, à 5 ans 54%	45 mois 1982-1989
<u>Bramwel (1992)</u>	CT préopératoire MTX HA + CDDP + ADR	307	50% estimée à 5 ans, sans récurrence 41 %	SD
<u>Bacci (1993)</u>	CT préopératoire MTX HD +ADR + CDDP IA	164	à 54 mois 77%,	34 à 76 mois 1986-1989
<u>Leung (1997)</u>	CT pré et postopératoire MTX HD= ADR + CDDP	27	à 70% EFS à 59%	59 mois
<u>Provisor (1997)</u>	CT Préopératoire MTXHD + BCD CT Postopératoire BR : MTX+BCD + doxorubicine MR : BCD+ doxorubicine+ CDDP	268	Globale 60% BR : 87% EFS : 53% MR : 52%	8ans

CT : chimiothérapie, **ADR** : adriamycine, **BCD** : bléomycine D, **CDDP** : cisplatine, **IFM** : ifosfamide, **MTX** : méthotrexate, **HD** : haute dose, **EFS** : Survie sans récurrence, **BR** : bon répondeur, **MR** : mauvais répondeur, **IA** : intra-artériel, **NS** : non significatif, **SD** : sans date.

Tableau B5 : quelques protocoles thérapeutiques appliqués au traitement de l'ostéosarcome

(D'après Philip *et al.*, 1999).

II – 4. Evolution de la chimiothérapie de l'ostéosarcome

Ces dernières années de nouvelles approches chimiothérapeutiques sont apparues. Elles ont pour but d'augmenter l'effet des agents antinéoplasiques classiques en les associant à des inhibiteurs des topoisomérases et montrent une bonne efficacité (Ferguson et Goorin, 2001 ; Estlin, 2002).

L'association de l'immunothérapie à la chimiothérapie est également utilisée et a été assez décevante : l'emploi du BCG (Bacille Calmette Guérin), ou des interférons n'améliorant pas la survie des patients (Ferguson et Goorin, 2001). L'utilisation du MTP-PE (muramyl tripeptide phosphatidyléthanolamine) composé dérivé du BCG en association avec des composés chimiothérapeutiques a donné de bons résultats sur un modèle d'ostéosarcome canin ainsi que chez des patients présentant un ostéosarcome récidivant (Kleinerman *et al.*, 1995). Ces résultats prometteurs ont débouché sur la mise en place d'essais cliniques de phase I II et III dont tous les résultats ne sont pas disponibles (Ferguson et Goorin, 2001).

Malgré ces innovations, le régime optimal de chimiothérapie applicable au traitement de l'ostéosarcome n'a pas encore été découvert.

II – 5. Facteurs pronostics de l'ostéosarcome

En dehors des paramètres qui caractérisent l'extension et le volume tumoral, d'autres facteurs regroupés dans le tableau B6, ont une valeur pronostique.

Facteur pronostique	Critère retenu	Pronostic
Localisation de la tumeur	Humérus, tibia Fémur, péroné	Favorable Défavorable
Age	< 12 ans > 21 ans	Défavorable Défavorable
Métastases au diagnostic	Présence	Défavorable
LDH phosphatases alcalines	Augmentation	Défavorable
Altérations de gènes	Surexpression de Erb2 Surexpression de la glycoprotéine P	Défavorable
Réponse à la chimiothérapie	Bon répondeur (nécrose tumorale >90%)	Favorable

Tableau B6 : Principaux facteurs pronostiques de l'ostéosarcome. (D'après Philip *et al.*, 1999 ; Ozaki *et al.*, 2002).

Globalement, le pronostic est surtout fonction de la réponse à la chimiothérapie préopératoire. De fait, lorsque la tumeur présente 90 à 95 % de nécrose, la survie à cinq ans est supérieure à 80% (Arndt et Crist, 1999). Cependant malgré l'amélioration indubitable du pronostic de l'ostéosarcome, il n'en reste pas moins qu'il s'agit d'un traitement lourd tant sur le plan médical que chirurgical, susceptible de donner lieu à de nombreuses complications.

II - 6. Nouvelles stratégies thérapeutiques applicables au traitement de l'ostéosarcome

Malgré les progrès réalisés dans le domaine de la chirurgie et de la chimiothérapie, ces dernières années le taux survie sans métastases à 2 ans stagne à 65-70%. Cette constatation associée à un pourcentage encore élevé, de 44%, de patients non répondeurs à la chimiothérapie préopératoire, justifie la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques (Arndt et Crist., 1999). Deux approches sont prometteuses : celles visant les cellules tumorales et faisant appel au concept de thérapie génique et la thérapie antiangiogénique.

II – 6 – 1. Système gène suicide/prodrogue et ostéosarcome

Parmi les stratégies de thérapie génique que nous avons évoquées toutes sont en théorie applicables au traitement de l'ostéosarcome. Si l'immunothérapie génique montre une certaine efficacité à prévenir la dissémination métastatique sur un modèle murin (Jia *et al.*, 2003), c'est la thérapie génique utilisant le système gène suicide/prodrogue qui suscite le plus grand intérêt.

Il ressort des quelques essais disponibles actuellement que le système gène suicide/prodrogue permet, du moins du moins dans des modèles animaux, un ralentissement une inhibition de la croissance tumorale voire mais prévient surtout la dissémination métastatique. Sur des modèles d'ostéosarcome de rat et humain greffé sur des souris nude Shirakawa montre la possibilité d'inhiber la dissémination métastatique grâce au système HSV-TK/gangyclovir (Shirakawa *et al.*, 1998). Cheon, quant à lui montre qu'une association de chimiothérapie à faible dose et du système HSV-TK/gangyclovir peut augmenter de manière significative la survie et inhiber la croissance tumorale de modèle d'ostéosarcome de rat ou humain greffé sur des souris nude (Cheon *et al.*, 1997). Plus proche de l'interface clinique, l'approche proposée par Charissoux sur le modèle d'ostéosarcome greffable de rat a

montré la possibilité de supprimer la dissémination métastatique et inhiber la croissance tumorale de 85% grâce à ce système HSV-TK/gancyclovir (Charissoux *et al.*, 1999).

Ces études mettent en évidence qu'une telle thérapie génique pourrait être applicable en traitement adjuvant de la chirurgie de la tumeur primaire, d'autant plus que le développement de nouveaux vecteurs de transfert de gène permet maintenant d'envisager une administration de la thérapeutique plus ciblée.

II – 6 – 2. Thérapie antiangiogénique de l'ostéosarcome

L'angiogenèse ainsi que les stratégies antiangiogéniques seront développées au chapitre suivant. L'inhibition de l'angiogenèse tumorale est une stratégie thérapeutique qui est de plus en plus explorée et qui montre une efficacité importante dans le traitement de certaines tumeurs aussi bien dans des essais précliniques que cliniques.

Cette stratégie possède des avantages par rapport aux approches plus classiques de chimiothérapie, qui dans l'optique d'application à l'ostéosarcome ne sont par négligeables. L'antiangiogenèse ne cible pas directement de les cellules tumorales mais le réseau vasculaire contournant ainsi le phénomène problème de résistance aux agents chimiothérapeutiques. De plus l'ostéosarcome est une tumeur très vascularisée qui métastase aux poumons essentiellement par voie sanguine. L'angiogenèse est impliquée dans la dissémination métastatique de l'ostéosarcome même après résection chirurgicale de la tumeur primaire (Tsunemi *et al.*, 2003). Ces constatations mettent en évidence que les stratégies antiangiogéniques apparaissent adaptées au traitement de l'ostéosarcome.

La thérapie antiangiogénique est encore peu appliquée dans cas de l'ostéosarcome, même dans des études précliniques. Actuellement les résultats de trois essais seulement sont disponibles mais prometteurs. Ces études utilisent comme facteur antiangiogénique le TNP

470 et montrent toutes trois la capacité de cette molécule, à ralentir la croissance tumorale et à inhiber *in vivo* la dissémination métastatique dans des modèles d'ostéosarcomes murin et de rat (Tsunemi *et al.*, 2003 ; Mori *et al.*, 1995 ; Morishita *et al.*, 1995). Par ailleurs Mori a pu mettre en évidence une diminution significative de la densité vasculaire des métastases due à l'action de l'agent antiangiogénique et que l'effet du TNP470 aussi bien sur la croissance tumorale que sur la dissémination métastatique est dose dépendante (Mori *et al.*, 1995 ; Morishita *et al.*, 1995). Ces résultats ouvrent une nouvelle voie de recherche thérapeutique pour le traitement de l'ostéosarcome, centrée sur le blocage de la vascularisation de la tumeur primaire, la privant d'apport en nutriments mais surtout de sa voie métastatique principale.

L'avancée des connaissances de l'angiogenèse et les progrès réalisés dans le domaine des biothérapies et le design des vecteurs de gènes permettent d'envisager une application de thérapie génique antiangiogénique pour l'ostéosarcome ayant de meilleurs effets et une toxicité moindre que la chimiothérapie. Ceci est d'autant plus envisageable que l'angiogenèse, que nous allons à présent développer, offre de nombreuses cibles potentielles pour la thérapie génique.

III. Angiogenèse tumorale et thérapies antiangiogéniques

III – 1. Définition

La formation des vaisseaux sanguins peut se faire selon deux mécanismes : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse correspond à la formation du réseau vasculaire au cours du développement embryonnaire mais elle n'intervient plus au cours de la vie adulte. L'angiogenèse quant à elle est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle intervient au cours du développement embryonnaire, et chez l'adulte, elle joue un rôle fondamental notamment dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta), la réparation tissulaire. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques (Risau, 1997). Lorsqu'un dysfonctionnement des mécanismes du contrôle de l'angiogenèse survient, elle peut être impliquée dans le développement et la progression de maladies variées. Parmi les pathologies les plus connues où un excès d'angiogenèse survient, on trouve les rétinopathies diabétiques, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le cancer (Carmeliet, 2003).

III – 2. Déroulement de l'angiogenèse tumorale

La croissance tumorale requiert la mise en place d'une vascularisation adéquate. L'angiogenèse tumorale est un processus complexe faisant intervenir deux types tissulaires, la tumeur et le réseau vasculaire, qui interagissent pour former des néovaisseaux. Le processus est initié par les cellules tumorales elles-mêmes. Les cellules endothéliales vasculaires sont les principaux acteurs de ce mécanisme mais les autres composants des vaisseaux tels que les péricytes, ou la matrice extracellulaire interviennent également.

Le déroulement de l'angiogenèse tumorale, peut être divisé en quatre étapes, chacune faisant intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires spécifiques (Figure B5).

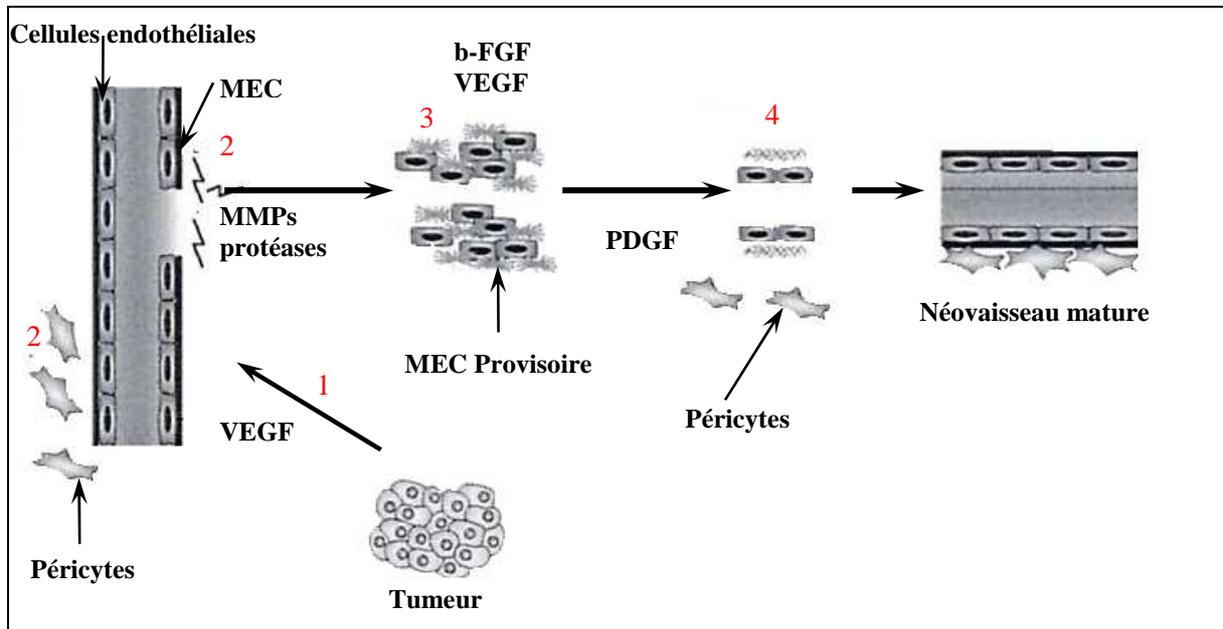


Figure B5 : Déroulement de l'angiogenèse tumorale. (D'après Kalluri, 2003).

- 1 : Activation des cellules endothéliales par le VEGF sécrété par les cellules tumorales
- 2 : Détachement des péricytes et dégradation de la membrane basale
- 3 : Prolifération et migration des cellules endothéliales vers la tumeur
- 4 : Formation du néovaisseau, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales

III – 2 – 1. Initiation de la réponse angiogénique

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur, d'une taille inférieure à 1-2 mm³, est indépendante de l'angiogenèse et l'apport de l'oxygène et des nutriments aux cellules tumorales est assuré par diffusion simple. (Folkman, 1990). Sous l'effet de l'accumulation des altérations génétiques, la prolifération des cellules tumorales devient plus active et la tumeur grossit au delà des limites de diffusion simple de l'oxygène ce qui génère un état hypoxique

intratumoral. Cette hypoxie induit une surexpression de gènes angiogéniques (Kerbel et Folkman, 2002 ; Pugh et Radcliffe, 2003). Les facteurs proangiogéniques sont alors en excès par rapport aux agents antiangiogéniques, et vont alors déclencher l'angiogenèse tumorale (Hanahan et Folkman, 1996).

III – 2 – 2. Activation des cellules endothéliales

La liaison du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) à son récepteur spécifique VEGF-R2 exprimé par les cellules endothéliales aboutit à l'activation de ces dernières (Abedi et Zachary, 1997 ; Shen *et al.*, 1999). Activées, ces cellules acquièrent de nouvelles propriétés de prolifération et d'invasion tissulaire ; elles vont, dans un premier temps, synthétiser plusieurs types d'enzymes (les Matrix Métallo Protéïnases (MMP), les héparinases l'activateur du plasminogène (uPA)) qui dégradent la matrice extracellulaire (MEC) soutenant les vaisseaux (Kalluri, 2003).

III – 2 – 3. Migration et prolifération des cellules endothéliales

Libérées de la MEC, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent en direction de la source du stimulus angiogénique : la tumeur. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape de l'angiogenèse sont le b-FGF, libéré par la dégradation de la MEC, et le VEGF (Griffioen et Molema, 2000).

La migration des cellules endothéliales est facilitée par la formation d'une matrice provisoire qui guide les cellules endothéliales vers leur cible. L'expression par les cellules endothéliales de protéines transmembranaires telles que les intégrines leur permet d'adhérer à des composants de la matrice extracellulaire facilitant ainsi leur progression vers la tumeur (Cheresh, 1993).

III – 2 – 4. Formation et stabilisation des nouveaux vaisseaux

Arrivées à proximité du stimulus, les cellules endothéliales se réorganisent en structures tubulaires, formant de nouveaux vaisseaux immatures mais fonctionnels. Les cellules endothéliales vont induire la mise en place de la paroi vasculaire (composée des péricytes et de la MEC) qui assure la stabilisation des nouveaux vaisseaux (Carmeliet, 2003).

Ayant mis en place sa propre vascularisation, la tumeur va croître de manière exponentielle et exprimer tout son potentiel agressif. En effet, l'angiogenèse soutient la croissance tumorale en fournissant l'oxygène et les nutriments nécessaires à l'expansion tumorale, en produisant des facteurs qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses et en fournissant aux cellules tumorales leur principale voie pour coloniser d'autres organes (Folkman, 1995).

III – 2 – 5. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux.

La structure des néovaisseaux tumoraux est différente de celle des autres organes. Pour s'adapter à la rapide croissance tumorale et aux besoins en oxygène et nutriments sans cesse grandissants de la tumeur, la vascularisation tumorale est soumise à une restructuration constante. Ce remodelage entraîne la constitution d'un réseau vasculaire chaotique, fragilisé, formé de vaisseaux de diamètre irrégulier dû en partie à la compression de la paroi vasculaire par les cellules tumorales en prolifération (Jain et Mumm, 2000). La paroi vasculaire est anormale, les péricytes ne forment pas un manchon complet autour des cellules endothéliales, ce qui explique la fragilité des vaisseaux tumoraux (Jain, 2003).

III – 3. Stratégies antiangiogéniques

Du fait de la forte dépendance de la tumeur vis à vis de l'angiogenèse, cette dernière est rapidement apparue comme une cible thérapeutique satisfaisante pour le traitement de cancers. Par rapport aux thérapeutiques classiques, notamment la chimiothérapie, la thérapie antiangiogénique offre l'avantage de ne pas entraîner la mise en place d'un mécanisme de résistance des cellules cibles vis à vis de la thérapie. En effet, la potentialité des cellules cancéreuses à échapper aux traitements cytotoxiques résulte principalement de leur instabilité génique qui conduit à la sélection de cellules tumorales réfractaires à la chimiothérapie. Les cellules endothéliales elles ne sont pas soumises à de telles mutations génétiques et ne développent pas en principe de résistance vis à vis des agents thérapeutiques.

De plus en plus d'inhibiteurs de l'angiogenèse sont identifiés et évalués, qu'il s'agisse d'agents pharmacologiques, tels que le néomastat, le batimastat ou la thalidomide, ou d'inhibiteurs endogènes, parmi lesquels l'angiostatine, l'endostatine, la thrombospondine sont les plus connus (D'Amato *et al.*, 1994 ; Boehm *et al.*, 1997). Tous ces agents visent à bloquer soit la prolifération des cellules endothéliales soit leur migration.

III – 3 – 1. Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales

La prolifération des cellules peut être bloquée soit indirectement par des agents neutralisant les facteurs pro-angiogéniques soit par des composés agissant directement au niveau des cellules endothéliales pour inhiber leur prolifération.

III – 3 – 1 – 1. Neutralisation des facteurs pro-angiogéniques

De part le rôle clé joué par le VEGF au cours de l'angiogenèse tumorale, l'inhibition de ce facteur de croissance est apparue comme une cible prometteuse pour la thérapie antiangiogénique. Parmi agents développés des inhibiteurs de la transduction du signal, tels

que le SU5416, ou des anticorps dirigés contre le récepteur du VEGF (VEGF-R2) sont en développement (Ferrara *et al.*, 2003). Ces composés, appliqués *in vivo* sur différents modèles de tumeurs murines (mélanome, carcinome du colon, cancer du sein) peuvent ralentir la progression métastatique (Wang *et al.*, 1998 ; Kong et Crystal, 1998)

Ferrara et son équipe ont été les premiers à montrer que les anticorps anti-VEGF ralentissaient la croissance tumorale sur des modèles de rhabdomyosarcome et de glioblastome développé par des souris nude (Kim *et al.*, 1993). Les formes humaines de ces anticorps sont actuellement dans les phases II d'essais cliniques pour le traitement du lymphome, du cancer rénal métastatique (Cancer.gov, juillet 2003).

III – 3 – 1 – 2. Inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales

Un des premiers agents antiprolifératifs identifiés est le *O*-chloroacetylcarbamoyle fumagillol ou AGM-1470/TNP-470 dérivant de la fumagilline (Ingber *et al.*, 1990). C'est un inhibiteur spécifique de la prolifération des cellules endothéliales, de leur migration et de la formation des tubes capillaires. Ce composé, qui prévient le développement de métastases dans des modèles de tumeurs animales telles que l'ostéosarcome, la tumeur hépatique (Mori *et al.*, 1995 ; Yoshida *et al.*, 1998), a été enrôlé dans des essais cliniques l'associant à la chimiothérapie et a fourni de bons résultats chez des patients présentant un cancer de la prostate (Logothetis *et al.*, 2001).

Ces dernières années plusieurs molécules endogènes exerçant une activité antiproliférative spécifique des cellules endothéliales ont été découvertes. Parmi ces molécules, dont le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé, se trouvent la thrombospondine-1 le « platelet factor-4 » (PF4), l'angiostatine, l'endostatine, la restine (O'Reilly *et al.*, 1994a ; O'Reilly *et al.*, 1997 ; Ramchandran *et al.*, 1999). Ces protéines ont, dès leur mise en évidence, été évaluées sur des tumeurs animales et ont montré une efficacité

à ralentir voire inhiber la croissance tumorale et inhiber le développement métastatique, et ce sur des modèles tumoraux variés allant du mélanome au carcinome pulmonaire de Lewis (Kobler *et al.*, 1995 ; O'Reilly *et al.*, 1997). Nous reviendrons plus en détail sur certains de ces inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans le chapitre III - 4.

La Figure B6 regroupe quelques inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales ainsi que leur cible cellulaire ou moléculaire.

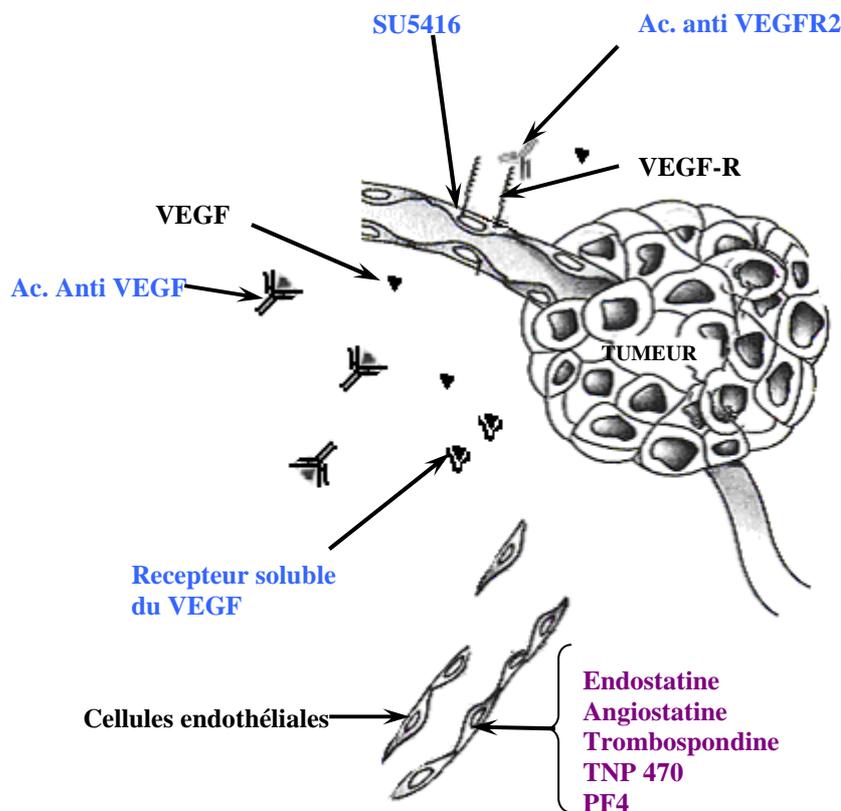


Figure B6 : Principaux agents inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales (d'après Klagsbrun et Moses, 1999).

Les inhibiteurs des facteurs pro-angiogéniques sont signalés en bleu. Certains préviennent la liaison du VEGF à son récepteur (anticorps anti-VEGF ou anti-VEGF-R2, récepteur soluble du VEGF) d'autre comme le SU5416 inhibe la voie de signalisation activée par le VEGF. Les agents inhibant directement la prolifération des cellules endothéliales sont en mauve.

III – 3 – 2. Inhibition de la migration des cellules endothéliales

La migration des cellules endothéliales peut être inhibée de deux façons (Figure B7) : en empêchant la dégradation de la MEC ou l'adhésion des cellules endothéliales aux composants de la MEC

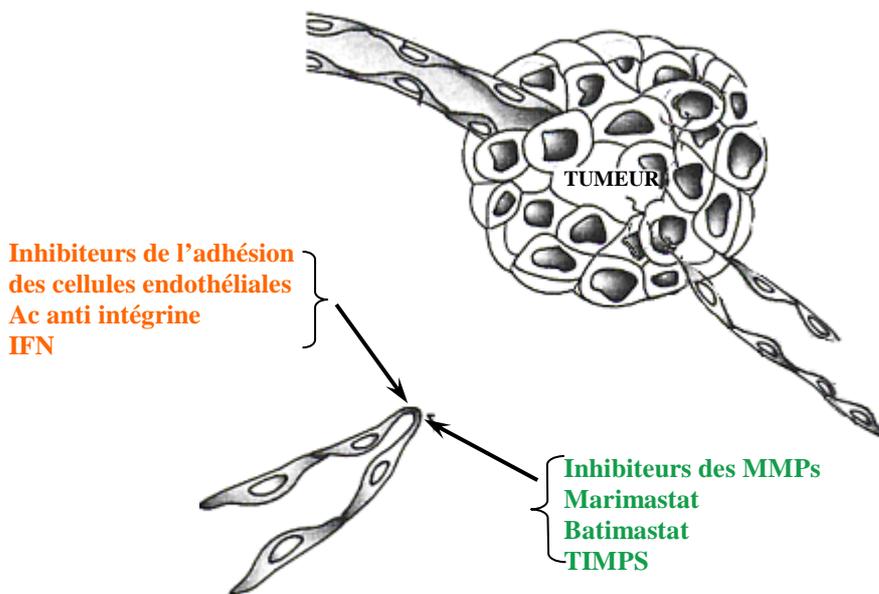


Figure B7 : Cibles moléculaires et principaux agents inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales. (D'après Klagsbrun et Moses, 1999).

Les inhibiteurs de la dégradation de la MEC sont signalés en vert. En orange sont indiqués les agents prévenant la l'adhésion des cellules endothéliales à la MEC provisoire. Ces agents ciblent des protéines exprimées par les cellules endothéliales. Ac : anticorps, IFN : interféron

III – 3 – 2 – 1. Inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire

L'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire a pour but d'empêcher l'invasion et la migration des cellules endothéliales et repose sur l'inhibition des enzymes protéolytiques essentiellement des métalloprotéinases

Parmi les inhibiteurs synthétiques des protéases utilisés dans des essais cliniques, le batimastat, le marimastat ou l'AG3340 ont un spectre d'action étendu. Le marimastat fait l'objet d'essais cliniques entre autre dans le cancer du sein, le mélanome (Quirt *et al.*, 2002, Miller *et al.*, 2002).

Ces inhibiteurs synthétiques n'ont pas de spécificité d'action tissulaire ; ils peuvent entraver l'action physiologiques des MMP et provoquer des dommages osseux. L'utilisation des inhibiteurs naturels des MMP ,les, « tissue inhibitors of metalloproteinases » (TIMP) devraient permettre de minimiser ces effets secondaires (Klagsbrun et Moses, 1999).

III – 3 – 2 – 2. Inhibition de l'interaction des cellules endothéliales à la MEC

Les interférons (IFN α , β) inhibent l'adhésion des cellules néoendothéliales à la matrice et possèdent tous les deux une activité antiangiogénique *in vivo* (Brouty et Zetter, 1980 ; Sidky et Borden, 1987). L'IFN α est d'ailleurs le premier agent angiostatique utilisé pour des essais cliniques.

La stratégie visant à bloquer les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, par l'utilisation d'anticorps dirigés contre elles, se révèle efficace puisqu'elle inhibe la croissance tumorale (Ruegg *et al.*, 2002). La vitaxine, anticorps anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$, fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase I et II.

Quelque soit leur mécanisme d'action qu'ils inhibent directement ou indirectement l'angiogénèse les inhibiteurs que nous venons de présenter sont tous capables de causer in

vivo un retard de la croissance tumorale sur des modèles animaux et grand nombre d'entre eux ont déjà intégré des essais cliniques allant de la phase I à III. Le tableau B7 présente quelques uns des essais cliniques actuellement en cours et utilisant des agents antiangiogéniques

Composé	Mécanisme d'action	Essai clinique en cours (juillet 2003)
Thalidomide	Inhibiteur des récepteurs du b-FGF et du VEGF	Phase I : Gliome malin
SU6668	Inhibiteur des récepteurs du b-FGF, du VEGF et du PDGF	Phase I : Tumeur solide avancée
IMC-1C11	Inhibiteur du récepteur du VEGF	Phase II : Cancer pulmonaire à petites cellules
Rhu Mab VEGF	Anticorps monoclonal dirigé contre VEGF	Phase II : Cancer rénal métastatique, lymphome, cancer de la prostate métastatique
BMS-275291	Inhibiteur synthétique des MMP	Phases I et II : Sarcome de Kaposi Phases II et III : Tumeur solide avancée
COL-3	Inhibiteur des MMP-2 et 9	Phase I et II : Tumeur du cerveau, sarcome de Kaposi
Néovastat	Inhibiteur synthétique des MMP	Phase II : Myélomes Phase III : Cancer rénaux, cancer pulmonaire
Vitaxine	Anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	Phase I et II : Cancer colorectal avancé
Interféron α -2	Inhibiteur du b-FGF, et du VEGF	Phase I, III : Tumeur solide avancée Phase I, II : Tumeur solide
IL-12	Augmentation de l'interféron γ et IP10	Phase I II : Sarcome de Kaposi
CAI	Inhibiteur du calcium	Phase I : Tumeur solide Phase II : Cancer des ovaires

Tableau B7 : Quelques essais cliniques de thérapie antiangiogénique en cours en juillet 2003.

(D'après Cancer.gov, juillet 2003)

III – 3 – 4. Inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse

Un nombre sans cesse croissant d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse sont découverts. Certains d'entre eux sont d'un intérêt particulier car ils sont issus du clivage protéolytique de molécules n'ayant aucune activité antiangiogénique. Des composants de la MEC peuvent libérer de tels agents : l'arrestine, la canstatine sont produites par le clivage du collagène IV, l'endostatine par celui du collagène XVIII, la restine est issue de la dégradation du collagène XV (Griffioen et Molema, 2000). La protéolyse de protéines plasmatiques peut également libérer des facteurs ayant une action antiangiogénique : c'est le cas du plasminogène dont le clivage libère l'angiostatine. Le rôle de ces composés dans l'angiogenèse physiologique et pathologique n'est pas complètement élucidé, mais ils offrent des opportunités pour supprimer l'angiogenèse tumorale, et ouvrent la voie de la thérapie génique antiangiogénique.

Les plus étudiés de ces agents sont l'angiostatine et l'endostatine. Ces deux molécules ont été isolées en partant de l'observation qu'une tumeur stimule sa propre croissance en produisant des facteurs pro-angiogéniques mais également des inhibiteurs de l'angiogenèse qui, libérés dans la circulation, empêchent le développement de foyers secondaires ou métastases (Hanahan et Folkman, 1996). Ces deux agents sont des inhibiteurs spécifiques et puissants *in vivo* de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales.

III – 3 – 4 – 1. Angiostatine

L'angiostatine est une protéine de 38 kDa résultant du clivage protéolytique du plasminogène. Elle est formée de quatre sous unités ou kringles. Elle possède la propriété d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales capillaires *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* sur un modèle de greffe de cornée.

L'angiostatine, isolée à partir d'un carcinome pulmonaire est le premier facteur endogène inhibant spécifiquement le processus d'angiogenèse qui a été isolé (O'Reilly *et al.*, 1994a ; O'Reilly *et al.*, 1994b). Des essais précliniques ont montré que l'administration systémique de cette protéine chez la souris produisait la régression considérable des tumeurs mammaires, de la prostate et du colon et prévenait le développement des métastases (O'Reilly *et al.*, 1996). Toutefois une administration répétée de l'angiostatine est nécessaire pour obtenir une régression de la tumeur. Contrairement à certaines molécules utilisées dans les traitements anti-cancéreux, il n'a pas été observé de phénomène de résistance lors de cette thérapie anti-angiogénique (Boehm *et al.*, 1997).

III – 3 – 4 – 2. Endostatine

L'endostatine est une protéine de 20 kDa, isolée à partir d'un hémangio-endothéliome de souris, correspondant à la fraction C-terminale du collagène XVIII (O'Reilly *et al.*, 1997). Le collagène XVIII est un composant naturel de la matrice extracellulaire des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins qui ne possède pas de propriété antiangiogénique. La découverte de l'endostatine laisse entrevoir l'existence d'un contrôle que les cellules de l'endothélium vasculaire exerceraient sur la croissance des cellules tumorales, en générant le relargage de facteurs solubles tels que l'endostatine. Le mécanisme de génération de l'endostatine par le collagène fait intervenir des enzymes (élastase, cathepsine) produites par les cellules endothéliales activées (Figure B8). Ces enzymes vont couper le collagène dans sa région C Terminale composée de trois parties : un domaine de trimérisation, une région centrale où sont localisés les sites du clivage protéolytique et une partie C Terminale de 22 kDa contenant l'endostatine, libérant l'endostatine qui va jouer dans l'angiogenèse physiologique un rôle régulateur encore mal connu (Zatterstrom *et al.*, 2000).

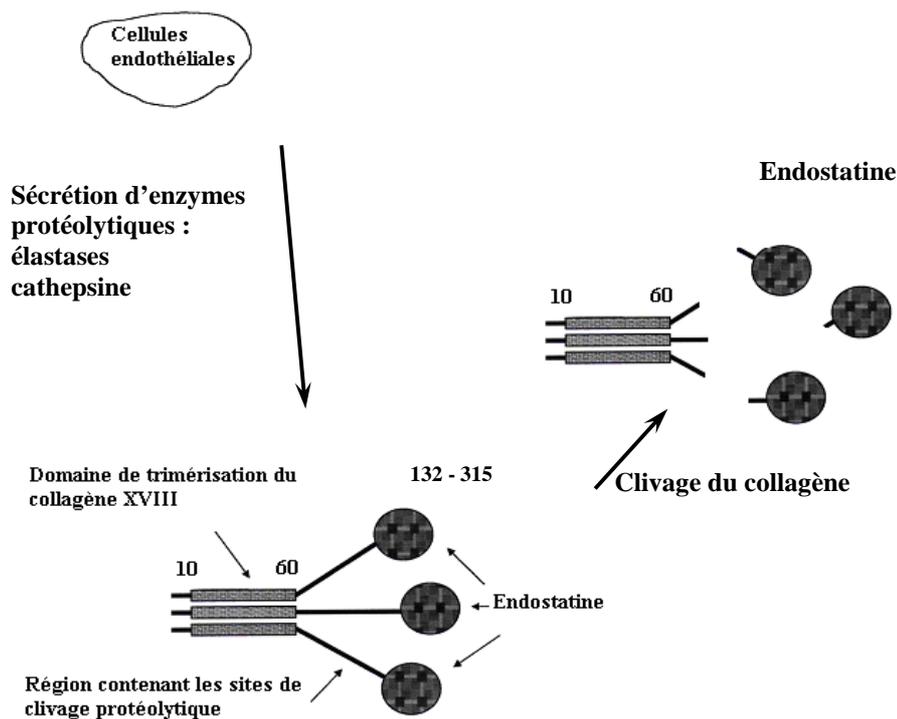


Figure B8 : Mécanisme de libération de l'endostatine à partir du collagène XVIII. (D'après Zatterstrom *et al.*, 2000).

L'analyse cristallographique de l'endostatine a permis d'en déterminer la structure. L'étude indique qu'il s'agit d'une protéine compacte et révèle la présence de 11 résidus arginine. Ces derniers permettent la liaison de l'endostatine avec l'héparine, base de l'hypothèse concernant l'action de l'endostatine sur les cellules endothéliales (Hohenester *et al.* 1998). En effet, l'endostatine pourrait exercer son action antiproliférative en entrant en compétition avec le b-FGF pour se lier aux héparanes sulfates et de ce fait perturber la transmission du signal mitogénique (Chang *et al.*, 1999). Toutefois, ce mécanisme ne semble être qu'une des composantes permettant une action inhibitrice de l'endostatine sur l'angiogenèse. En effet, une interaction de l'endostatine avec les intégrines a également été mise en évidence (Rehn *et al.*, 2001). *In vitro*, l'endostatine inhibe spécifiquement la

prolifération des cellules endothéliales et est un inducteur de l'apoptose cellulaire (Dhanabal *et al.*, 1999b).

Boehm a le premier mis en évidence l'action antiangiogénique *in vivo* de l'endostatine. L'injection systémique de 20 mg/kg/jour d'endostatine recombinante à des souris porteuses d'un carcinome pulmonaire provoque une inhibition du développement des métastases et de la croissance tumorale, pouvant aller jusqu'à une régression de la tumeur à un stade microscopique. Comme dans le cas de l'angiostatine, aucun phénomène de résistance n'a été décelé lors de cet essai (Boehm *et al.*, 1997 ; Kerbel *et al.*, 1997).

De nombreuses études menées *in vivo* sur des modèles tumoraux de mélanome, fibrosarcome, carcinome pulmonaire de Lewis et utilisant l'endostatine aussi bien sous forme protéique que sous forme de thérapie génique ont montré que cet agent inhibe la croissance de tumeurs primaires, prévient l'angiogenèse tumorale et la dissémination métastatique (O'Reilly *et al.*, 1997 ; Dhanabal *et al.*, 1999c ; Yokoyama *et al.*, 2000). Toutes ces études suggèrent que l'endostatine agit de manière spécifique en inhibant l'angiogenèse tumorale et sans affecter directement les cellules tumorales. Ces résultats ont généré beaucoup d'espoir, l'endostatine est rapidement apparue comme étant un des inhibiteurs les plus prometteurs.

Des essais toxicologiques et cliniques de phase I ont été initiés très peu de temps après la découverte de cette protéine. Ces études, dont les résultats ont été récemment publiés, ont montré que l'endostatine n'était pas toxique et que des doses équivalentes à celles efficaces chez l'animal pouvaient être facilement atteintes chez l'homme (Herbst *et al.*, 2002 ; Thomas *et al.*, 2003). Par contre ces essais se sont révélés décevants en ce qui concerne l'efficacité antitumorale de l'endostatine, aucune réponse partielle ni aucune diminution de la vascularisation tumorale n'ayant été observées (Thomas *et al.*, 2003).

III – 3 – 4 – 3. Troponine I musculaire

La recherche de nouveaux inhibiteurs de l'angiogénèse a permis récemment à Moses (1999) de mettre en évidence, pour la première fois, la présence de l'isoforme du muscle strié à contraction rapide de la troponine I (TnI) dans le cartilage, tissu non vascularisé et fournisseur de nombreux inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse (Moses *et al.*, 1999). La TnI est la sous unité régulatrice du complexe des troponines et est impliquée dans la régulation de la contraction musculaire (Figure B9). Jusqu'à l'étude de Moses, la présence de cette protéine dans un tissu autre que les muscles n'avait jamais été rapportée.

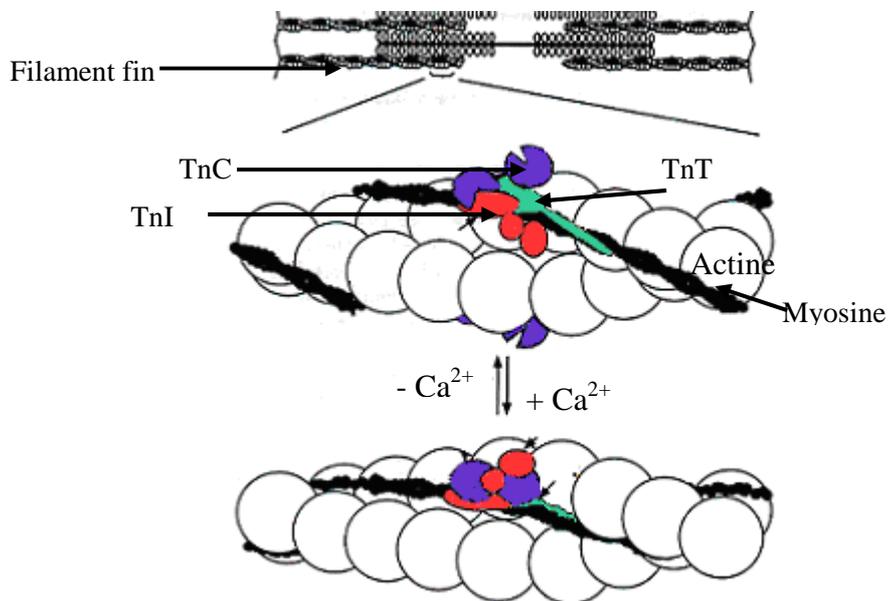


Figure B9 : Rôle de la TnI dans la contraction musculaire. (D'après Farah et Reinhard, 1995).

La TnI interagit avec la TnC de manière calcium dépendante. Au repos la TnI empêche la fixation de la tête de myosine sur l'actine. Au cours de la contraction musculaire, la fixation du calcium à la TnC entraîne un changement conformationnel de la TnI et de la tropomyosine, permettant la fixation de la tête de la myosine sur l'actine

La TnI existe sous trois isoformes : des isoformes du muscle squelettique lent et rapide et l'isoforme cardiaque qui est relarguée dans la circulation juste après un accident cardiovasculaire (ischémie, infarctus). Du fait de sa cardiospécificité importante, la TnI

cardiaque est l'isoforme la mieux connue et son dosage est couramment utilisé en diagnostic clinique d'ischémie myocardique (Plebani *et al.*, 2001).

Moses a montré que l'isoforme du muscle squelettique à contraction rapide de la TnI est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. La mise en évidence de son action antiangiogénique est récente, peu d'études relatives à l'action de cette protéine sont menées à ce jour, les connaissances concernant son mécanisme d'action sont minimes (Moses *et al.*, 1999 ; Feldman *et al.*, 2002). Une des hypothèses émises est que la TnI, protéine riche en lysine, se lie à l'héparane-sulfate protéoglycane de la surface cellulaire et entre ainsi en compétition avec le b-FGF et peut-être le VEGF.

Les produits antiangiogéniques, synthétiques ou endogènes, que nous venons de présenter ont montré leur efficacité dans différents modèles tumoraux. Ils peuvent inhiber ou ralentir la croissance tumorale et maintenir les micrométastases à l'état dormant, rendant leur administration possible en traitement adjuvant des thérapeutiques conventionnelles. Un bon nombre d'entre eux (environ une quarantaine) sont impliqués dans des essais cliniques de phase I à III.

Toutefois la thérapie antiangiogénique telle qu'elle est appliquée à l'heure actuelle présente certaines limitations. La thérapie antiangiogénique repose pour l'instant sur l'administration répétée par voie systémique de composés pharmacologiques ou d'inhibiteurs endogènes, qui peuvent présenter des effets secondaires non négligeables. Ces agents peuvent diffuser dans tout l'organisme et risquent de perturber les processus de néovascularisation physiologiques. De plus, une des principales limites à l'utilisation des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans des essais cliniques reste la difficulté à produire les quantités

importantes de protéine, ayant une courte vie biologique, nécessaire à la thérapie (Dhanabal *et al.*, 1999a).

Une administration de ces inhibiteurs sous forme de thérapie génique paraît une alternative intéressante, c'est donc vers une approche de thérapie génique antiangiogénique que l'on s'oriente.

III – 3 – 5. Thérapie génique antiangiogénique

La thérapie génique permettrait une amélioration des traitements conventionnels grâce à une production locale importante de l'agent thérapeutique. Dans l'idéal, le transfert d'un gène antiangiogénique dans un organe cible spécifique permettrait d'obtenir une expression et une activité de la protéine thérapeutique uniquement au niveau de la tumeur. La thérapie génique fournirait également un effet antiangiogénique local constant dans la mesure où l'expression du transgène persiste dans le temps. La thérapie génique antiangiogénique suscite ces depuis quelques années un grand intérêt, un grand nombre de groupes s'intéressent à cette approche.

Les méthodes de transfert et les gènes utilisés pour la thérapie génique antiangiogénique sont aussi nombreux que les modèles tumoraux utilisés. Si dans les premiers temps les vecteurs viraux étaient les plus utilisés, du fait des risques liés à leur utilisation on note un intérêt croissant pour les techniques de transfert non virales, particulièrement pour les liposomes cationiques (Chen *et al.*, 1999 ; Sacco *et al.*, 2001). Ces derniers sont d'un usage plus sûr que les vecteurs viraux et possèdent une affinité particulière pour les cellules néoendothéliales tumorales (Krasnici *et al.*, 2003). Cette particularité fait des liposomes cationiques des vecteurs de choix pour une application de thérapie génique antiangiogénique, permettant, après administration par voie intraveineuse, l'adressage des gènes dans les cellules endothéliales.

La thérapie génique antiangiogénique a pour but soit de bloquer les facteurs proangiogéniques soit de stimuler les inhibiteurs de l'angiogenèse.

III – 3 – 5 – 1. Inhibition des facteurs proangiogéniques

C'est essentiellement le VEGF, qui est la cible de cette approche. Les stratégies de thérapie génique employées pour bloquer directement le VEGF ou sa voie de signalisation sont variées : elles vont de l'utilisation d'ARNm antisens à la modification de la séquence codante d'un récepteur au VEGF, entraînant une modification de sa structure (Chen *et al.*, 1996, Im *et al.*, 1999). Millauer a montré, chez la souris athymique que l'infection de cellules endothéliales par un rétrovirus codant le récepteur du VEGF muté était capable de bloquer la signalisation du VEGF et de bloquer la croissance du glioblastome (Millauer *et al.*, 1996). L'approche consistant à transfecter les cellules tumorales par un ADNc codant pour un récepteur soluble du VEGF a montré son efficacité à inhiber la croissance tumorale dans plusieurs modèles tumoraux dont un modèle de fibrosarcome humain et un de neuroblastome (Goldman *et al.*, 1998 ; Davidoff *et al.*, 2001).

III – 3 – 5 – 2. Augmentation des facteurs proangiogéniques

La mise en évidence des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse a ouvert la voie à cette application de thérapie génique, et grand nombre d'essais de thérapie génique a pour but d'augmenter les stimuli antiangiogéniques. Le but est alors d'induire la synthèse et la sécrétion, par les cellules tumorales ou endothéliales, d'une protéine possédant une action spécifique des cellules endothéliales. Parmi les inhibiteurs naturels de l'angiogenèse les plus impliqués dans des protocoles de thérapie génique se trouvent l'angiostatine et l'endostatine.

Le transfert du gène de l'angiostatine inhibe la formation des vaisseaux, le développement tumoral et bloque le processus métastatique dans des modèles carcinome, de gliome (O'Reilly *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000 ; Fukumori *et al.*, 2002).

L'endostatine est elle aussi évaluée dans différents modèles tumoraux avec plus ou moins de succès. Le transfert du gène de l'endostatine prévient *in vivo* la croissance et la dissémination métastatique de certains modèles tumoraux (carcinome pulmonaire, cancer du sein, cancer du colon) (Boehm *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 1999 ; Dkhissi *et al.*, 2003). Cependant l'endostatine se révèle par contre inefficace, appliquée sous forme de thérapie génique, à induire un quelconque effet dans des modèles de leucémie ou de neuroblastome (Eisterer *et al.*, 2002 ; Jouanneau *et al.*, 2002). Ces résultats pourraient être des indicateurs de l'existence d'une certaine action tissu-spécifique de l'endostatine rapportée récemment par Dkhissi (Dkhissi *et al.*, 2003).

La thérapie génique autorise des approches plus originales que les thérapeutiques plus conventionnelles. Elle permet de construire de protéines chimères résultant de la fusion des gènes codant pour deux protéines. La statine, produit de la fusion du gène de l'angiostatine et de l'endostatine induit une réponse antiangiogénique supérieure à celle observée lorsque chaque gène est utilisé seul (Scappaticci *et al.*, 2001).

La thérapie génique antiangiogénique est une approche relativement nouvelle comparée aux stratégies conventionnelles et montre déjà sa validité pour être appliquée en traitement adjuvant de tumeurs solides ; elle est capable d'induire dans de nombreux modèles animaux des retards de croissance de la tumeur.

Quelques unes des stratégies de thérapie génique évaluées à l'heure actuelle sont regroupées dans le tableau B8.

Gène	Vecteur	Modèle et réponse observée
VEGF antisens	AAV	In vivo: Carcinome HNSCC Inhibition de la croissance tumorale
FLT-1 soluble	Adénovirus	<i>In vivo</i> : fibrosarcome HT-1080 Inhibition de la croissance tumorale
Récepteur VEGF-2	Rétrovirus	<i>In vivo</i> : Tumeur rénale murine/ neuroblastome murin Diminution de la croissance tumorale
Antagoniste uPA/UPAR	Adénovirus	<i>In vivo</i> : Carcinome du colon souris nude Inhibition de la dissémination métastatique Allongement de la survie
Récepteur soluble Tie2	Adénovirus	<i>In vivo</i> Inhibition de la dissémination métastatique

Tableau B8 : Quelques exemples de thérapie génique antiangiogénique visant à inhiber les stimuli pro-angiogéniques

Gène	Vecteur	Modèle et réponse observé
Angiostatine	AAV	<i>In vivo</i> : Gliome de rat Inhibition de la croissance tumorale Ralongement de la survie
	Liposome	<i>In vivo</i> : Cancer du sein murin Inhibition de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique
Endostatine	ADN plasmidique	<i>In vivo</i> : Carcinome mammaire Mca-4 murin Inhibition de la croissance tumorale Diminution de la vascularisation tumorale
	Liposome	<i>In vivo</i> : Cancer du sein murin, tumeur hépatique Inhibition de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique
	Adénovirus	<i>In vivo</i> : Cancers du colon (HT29 ; C51) Inhibition de la croissance tumorale Diminution de la vascularisation tumorale
IL-4	Rétrovirus	<i>In vivo</i> : Gliome murin et de rat Diminution de la croissance tumorale
IFN- α	Rétrovirus	<i>In vitro</i> : Inhibition de la migration de cellules endothéliales <i>In vivo</i> : sarcome de Kaposi sur souris nude: réduction de la croissance tumorale
IFN- β	Transformation <i>in vitro</i> de cellules PC-3M	<i>In vivo</i> : Cancer de la prostate PC-3M souris nude Inhibition de la dissémination métastatique, diminution de l'angiogenèse tumorale
TIMP-1	Adénovirus	<i>In vitro</i> : Cellules endothéliales BAE Inhibition de la migration des cellules endothéliales
TIMP-2	Liposome	<i>In vivo</i> : Carcinome hépatique HuH7 sur souris nude Inhibition de l'angiogenèse tumorale et Augmentation de la nécrose tumorale
TSP-1	Liposome	
p53	Liposome	<i>In vivo</i> : B16-F10 mélanome murin Inhibition de la dissémination métastatique
PF-4	Rétrovirus	<i>In vivo</i> : Glioblastome inhibition de la croissance tumorale

Tableau B8 (suite) : Quelques exemples de thérapie génique antiangiogénique visant à augmenter les agents anti-angiogéniques

Certes des améliorations restent à apporter à la thérapie génique antiangiogénique, concernant notamment les systèmes de transfert et le contrôle de l'expression des gènes. Il reste à mettre au point des vecteurs permettant d'augmenter et de maintenir des taux d'expression du transgène élevés, d'induire une expression spécifique du tissu, et de réguler cette expression. Il faut certes que le facteur angiogénique puisse être produit de façon prolongée mais il faut aussi que cette production soit limitée à la tumeur. Si des améliorations concernant l'adressage des vecteurs ont déjà été apportées, on maîtrise encore mal la durée et le niveau de l'expression d'un transgène. Si celle-ci doit être suffisante pour maintenir une concentration efficace de la protéine d'intérêt, il ne faut pas non plus qu'elle soit excessive ou même continue. C'est donc vers une régulation d'expression des gènes (choix de séquences régulatrices ou système d'expression conditionnelle) que les nouvelles stratégies de thérapie génique devront s'orienter (Fusseneger, 2001).

Malgré les améliorations restant à apporter, cette thérapie nous apparaît une approche d'avenir. Elle possède une toxicité moindre que la chimiothérapie, est applicable en théorie à un grand nombre de tumeurs dépendant de l'angiogenèse et permettrait d'obtenir une expression de la protéine thérapeutique localisée au niveau de la tumeur évitant ainsi les effets secondaires. De plus le développement des vecteurs de transfert non viraux tels que les liposomes cationiques permet une application plus sûre de cette thérapie, et un certain ciblage tumoral.

Aucun essai de thérapie génique antiangiogénique concernant l'ostéosarcome n'a été à ce jour rapporté. L'ostéosarcome, tumeur très vascularisée et à un fort potentiel métastatique, est pourtant le type même de néoplasme pouvant bénéficier des avantages de la thérapie génique antiangiogénique. Cette approche thérapeutique n'entraîne pas de résistance comme la chimiothérapie, et prévient en théorie la dissémination métastatique ; elle devrait donc permettre de maintenir l'ostéosarcome au stade de tumeur locale.

Dans ce contexte de mise au point d'une thérapie génique antiangiogénique applicable à l'ostéosarcome nous avons comparé l'effet de deux gènes, l'endostatine et la TnI, sur un modèle d'ostéosarcome de rat reproduisant les caractéristiques de l'ostéosarcome humain. Nous avons choisi d'utiliser des liposomes cationiques comme vecteurs de gènes, plus sûrs et moins coûteux à produire que les vecteurs viraux. Dans cette étude nous souhaitons pouvoir mettre en évidence la validité de la thérapie génique antiangiogénique non virale pour le traitement adjuvant de l'ostéosarcome.

MATERIEL ET MÉTHODES

I. Techniques de biologie moléculaire appliquées à la construction du plasmide recombinant pSecTnITag

I – 1. Extraction des ARN totaux

Cette opération est réalisée dans le but d'isoler l'ARN messager (ARNm) de la Troponine I musculaire humaine (TnI) à partir d'un fragment de muscle squelettique. L'extraction est effectuée à l'aide du réactif « Tripure Isolation Reagent » (Roche, Meylan, France).

Les cellules musculaires sont lysées dans la solution Tripure (1 ml/100 mg de muscle) et incubées 5 min à température ambiante pour dissocier les complexes nucléoprotéiques. Du chloroforme (0,2 ml/ml de Tripure) est ensuite ajouté. Les phases sont séparées par centrifugation (12000g, 4°C, 15 min). Les ARN totaux localisés exclusivement dans la phase aqueuse supérieure, sont récupérés et précipités à l'aide d'isopropanol (vol/vol) et lavés par une solution d'éthanol à 75%. Le culot est séché puis repris dans 20 µl d'eau stérile contenant du diéthylpyrocarbonate (DEPC). La qualité des ARN est contrôlée par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%.

I – 2. Transcription inverse (RT)

La transcription inverse permet de transcrire un ARNm en son ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la transcriptase inverse. Cette enzyme a pour substrat les ARN à partir desquels elle synthétise un brin complémentaire d'ADN, grâce à une amorce polydT s'hybridant sur la séquence polyA des ARNm. Cette technique est réalisée en utilisant le kit « Superscript Preamplification System » (Invitrogen, Groningen, Pays-Bas). Elle permet

d'obtenir et d'amplifier une partie de la séquence codante du gène de la TnI à partir de muscle squelettique humain.

Dans un premier temps, 3 à 4 µg d'ARN totaux sont incubés avec 0,5 µg d'oligoDT pendant 10 min à 70°C dans un thermo-bloc chauffant (Crocodile II, Q-Biogen, Illkirch, France). Le mélange est ensuite refroidi dans la glace puis pré-incubé 5 min à 42°C avec le tampon de la transcriptase (tampon de transcription 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTP 0,5 mM, DTT 10 mM). La synthèse de l'ADNc est effectuée à 42°C pendant 50 min en présence de 200 U de transcriptase inverse qui est ensuite inactivée par une incubation de 15 min à 70°C. Enfin la matrice d'ARN est éliminée par l'action de 2 U de RNase H, 20 min à 37°C.

I – 3. Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN présente en faible quantité.

L'ADNc monocaténaire obtenu à l'issue de la RT est amplifié par PCR. Cinq µl de produit de RT sont incubés avec 0,5 U de DNA polymérase de *Thermus aquaticus* (QBiogen) en présence de tampon 1X, de dNTP 0,2 M et d'amorces 0,4 mM dans un volume réactionnel de 50 µl. Les amorces utilisées pour le clonage de l'ADNc de la TnI sont choisies d'après Moses (1999). Ces amorces possèdent des bases ajoutées (signalées en bleu) afin de permettre la ligation du produit de PCR dans le vecteur plasmidique selon le protocole « DiTriSec ». La séquence nucléotidique de ces amorces qui permettent l'amplification d'une séquence de 552 pb est :

Amorce sens : 5' GCTATCGGAGATGAGGAGAAGCG 3'

Amorce antisens : 5' GCTACCGGACTCGGACTCAAACAT 3'

L'amplification est effectuée dans un thermocycleur Crocodile II (Q-Biogen) et comporte les étapes suivantes :

Phase	Durée et température	Nombre de cycles
Dénaturation	2 min à 94 °C	1
Dénaturation	1 min à 94 °C	35
Hybridation	1 min à 59 °C	
Extension	1 min à 72 °C	
Extension	2 min à 72 °C	1

Tableau M1 : Programme PCR pour amplification de la séquence codante TnI.

La PCR est une méthode d'amplification sensible ; plusieurs contrôles sont inclus lors des réactions afin de s'assurer de l'absence de contamination des échantillons par de l'ADN exogène :

- un contrôle négatif de PCR, obtenu par réaction avec les amorces spécifiques du gène d'intérêt et un ARN contrôle du kit
- un contrôle positif obtenu par réaction de l'ARN contrôle avec ses amorces spécifiques.

Les produits de l'amplification sont déposés sur gel d'agarose 0,8% afin de vérifier leur taille. Une confirmation de l'identité des produits obtenus par PCR est réalisée par digestion des fragments amplifiés par l'endonucléase de restriction *Pvu* II qui génère deux fragments de taille 205 et 347 pb.

Les produits de l'amplification sont purifiés selon le protocole du kit « QIAquick Purification » (QIAGEN) puis dosés en spectrophotométrie. La méthode de dosage est décrite au paragraphe I – 4

I – 4. Quantification des acides nucléiques en spectrophotométrie

La concentration d'une solution en ng d'acides nucléiques/ μ l est calculée selon la formule :

$$\frac{A(260) \times \epsilon \times V_T}{V_E}$$

A (260) est l'absorbance mesurée à 260 nm. V_T et V_E sont respectivement le volume total de la réaction et le volume de l'échantillon d'acides nucléiques en μ l. ϵ représente le coefficient d'extinction molaire spécifique pour chaque acide nucléique : 33 pour l'ADN monocaténaire, 50 pour l'ADN bicaténaire et 40 pour l'ARN.

Le rapport des absorbances à $\lambda_{260 \text{ nm}}$ et $\lambda_{280 \text{ nm}}$ indique la pureté de la solution. L'absorbance à 280 nm donne une estimation de la quantité de protéines dans l'échantillon. Le rapport doit être supérieur à 1,8 pour les ADN et à 2 pour les ARN.

I – 5. Electrophorèse en gel d'agarose

Les ARN ou les produits de PCR dilués dans du tampon échantillon 6 X (xylène cyanol et le bleu de bromophénol 2,5 mg/ml, glycérol 60 %, eau distillée 40%) sont séparés par une électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon TAE (TAE 50X : Tris-HCl 0,5 M, acide acétique 50 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4) et en présence de bromure d'éthidium (BET) 0,5 μ g/ml. Le BET s'intercale entre les bases des acides nucléiques et permet leur visualisation lors de l'irradiation par les UV.

I - 6. Construction du plasmide pSecTnITag

I – 6 – 1. Plasmide pSecTag2C

La séquence codante de la TnI est insérée dans un vecteur plasmidique pSecTag2C (Invitrogen).

Les principales caractéristiques du plasmide pSecTag2 sont présentées dans la Figure ci-dessous. Ce plasmide comporte deux séquences particulières :

- une séquence de sécrétion, la séquence signal de l'Igκ murine, permettant l'exportation de la protéine d'intérêt dans le milieu de culture.
- une séquence codant pour l'épitope c-myc en aval du MCS, qui permet, si le cadre de lecture est conservé, de détecter la protéine de fusion (Figure M1).

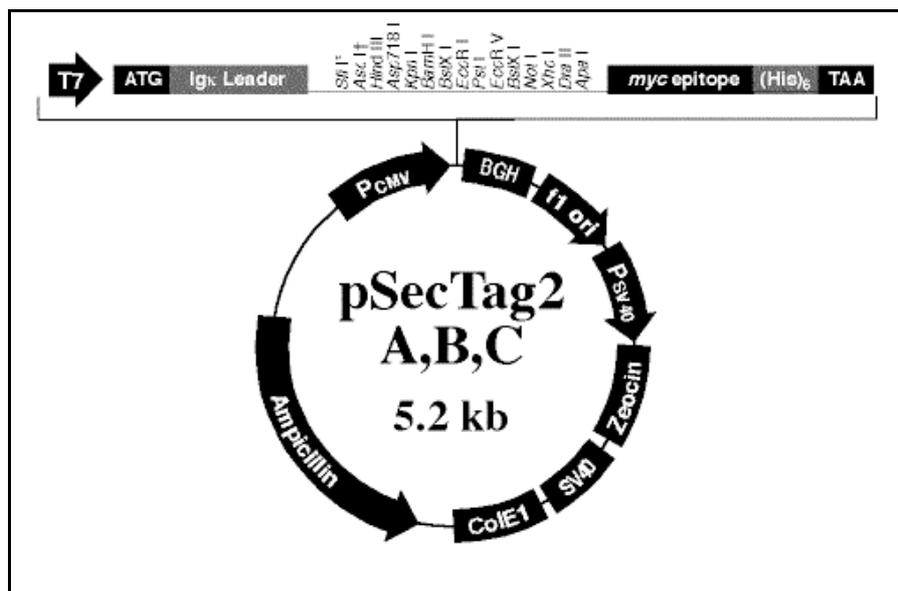


Figure M1 : Schéma du plasmide pSecTag2 (Invitrogen)

I – 6 – 2. Clonage de l'ADNc de la TnI dans le plasmide : méthode « Di/Tri-Sec »

La méthode de clonage utilisée est appelée « Di/Tri-Sec » (Roche), a été décrite par Vieira (Vieira et Messing, 1987). Le principe de cette technique, qui permet de réduire les insertions non spécifiques de l'ADNc dans le vecteur de clonage, est représenté sur la Figure M2 et se décompose en 2 parties:

- modification du produit de PCR et du plasmide
- ligation du gène d'intérêt dans le plasmide linéarisé.

Le produit de PCR et le plasmide sont modifiés de manière à permettre le clonage du produit de PCR au niveau du site *Hind* III du « Multiple Cloning Site » (MCS) du vecteur pSecTag2C.

I – 6 – 2 – 1. Préparation du plasmide et du produit de PCR

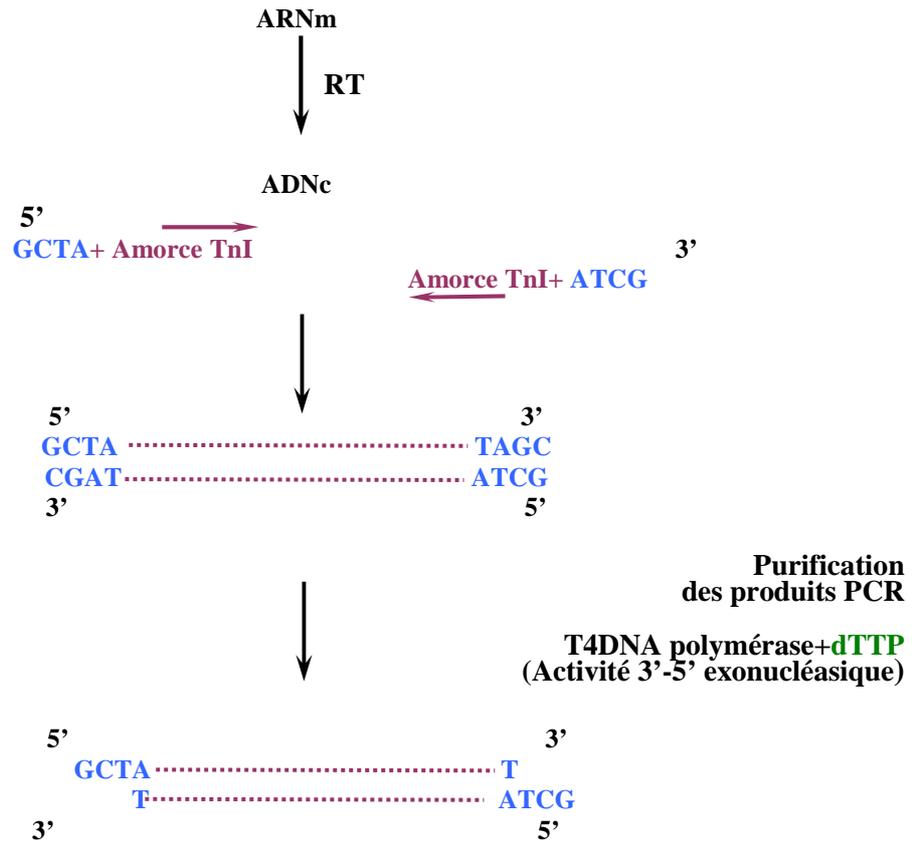
I – 6 – 2 – 1 – 1. Linéarisation du plasmide

Le plasmide linéarisé par *Hind* III est modifié par adjonction de bases au niveau du site de restriction afin d'éviter tout phénomène de re-ligation sur lui-même. Le plasmide linéarisé (5 µg) est incubé avec des nucléotides triphosphates (dATP, 0,1 mM) et une enzyme (Klenow polymérase, 20 U), pendant 15 min à température ambiante, afin de remplir les extrémités 3' sortantes du vecteur.

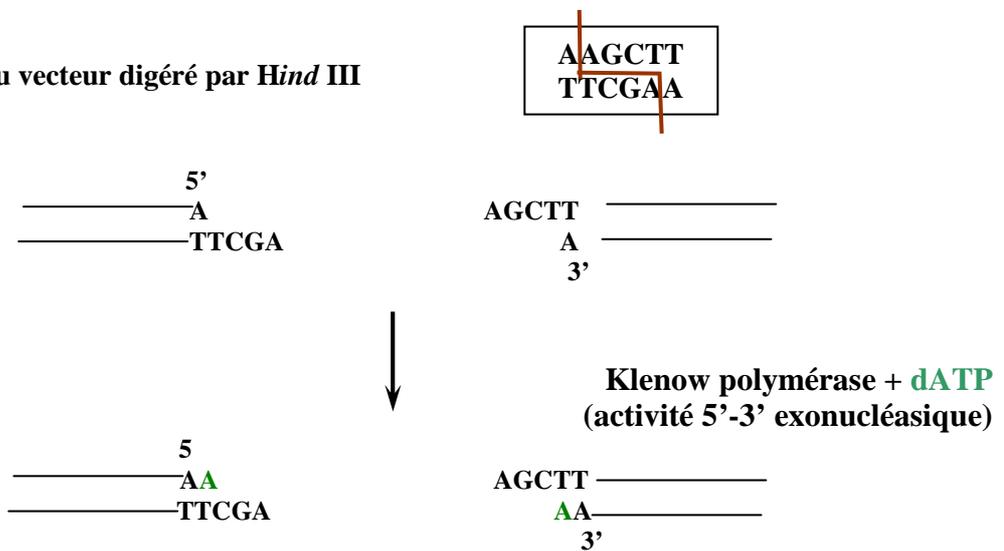
I – 6 – 2 – 1 – 2. Modification du produit de PCR

La séquence codante de la TnI obtenue par PCR est incubée en présence de nucléotides triphosphates (dTTP, 2 mM, Q Biogen) et de T4 DNA polymérase (1 U/µl), la réaction se déroulant à 12°C pendant 30 min. L'enzyme est ensuite inactivée par chauffage à 80°C pendant 15 min.

1) Modification de l'insert TnI



2) Modification du vecteur digéré par *Hind* III



3) Ligation insert et plasmide modifiés



Figure M2 : Schéma du protocole « Di/Tri-Sec »

I – 6 – 2 – 2. Ligation

L'ADNc de la TnI modifié et le plasmide linéarisé sont purifiés séparément par précipitation avec 2,5 vol d'éthanol absolu / 0,1 vol acétate de sodium 3M puis lavés dans de l'éthanol 70%. Chaque culot est séché et repris dans 20 µl d'eau distillée stérile et la concentration de la suspension est déterminée par spectrophotométrie. Afin de réaliser la meilleure ligation possible, l'insert et le plasmide doivent être apportés dans des proportions précises, situées entre 10 et 20 molécules d'insert par molécule de plasmide.

Le nombre nécessaire à la réaction de molécules/µl pour chaque acide nucléique est déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$M = [\text{concentration de l'ADN (g/l)} \times N] / \text{poids moléculaire de l'insert (g/mol)}$$

N : nombre d'Avogadro = $6,02 \cdot 10^{23}$

La ligation est réalisée par incubation à 15 °C pendant 15 h du mélange réactionnel ci-dessous.

Composé	Quantité
pSecTag2C	270 ng
Produit de PCR modifié	20 ng
Tampon de ligation (10X)	1 X
T4 DNA ligase	3 U
H ₂ O stérile pH 7	qsp 20 µl

Tableau M2 : Composition du mélange réactionnel de ligation

Le plasmide recombinant issu de la ligation est nommé pSecTnITag.

Au cours de notre travail, nous utilisons un autre plasmide recombinant : le plasmide pSecEndo contenant la séquence codante de l'endostatine murine. Ce plasmide est le produit du clonage de l'endostatine murine dans le vecteur pSecTag2, réalisé précédemment par notre équipe.

I – 7. Amplification des plasmides recombinants

I – 7 – 1. Transformation bactérienne

La transformation est réalisée par choc thermique. Le produit de ligation, ou le plasmide commercial (pSecTag2) (50ng) est mélangé à 50 µl de bactéries compétentes *Escherichia coli* JM 109 (Promega, Madison, USA). L'ADN pénètre à l'intérieur des bactéries à la suite d'un choc thermique : l'ensemble placé 20 min dans la glace est ensuite incubé 45 à 50 s à 42°C puis de nouveau dans la glace pendant 2 min. La prolifération des bactéries transformées est initiée par une incubation d'1 h à 37°C sous agitation dans 900 µl de milieu SOC (2g Bacto-Tryptone, 0,5g Bacto-Yeast Extract, NaCl 1 M, KCl 1M, MgCl₂ 2M, Glucose 2M). Des fractions de 100 à 200 µl de ce mélange sontensemencées sur boîtes de gélose LB-agar (Sigma) contenant 100 µg/ml d'ampicilline (Q-Biogen) comme antibiotique de sélection spécifique du plasmide. La croissance des clones bactériens s'effectue sur la nuit à 37°C.

I – 7 – 2. Amplification et extraction d'ADN plasmidique

I – 7 – 2–1. Minipréparation

Le but de la minipréparation est de vérifier l'identité du produit de ligation.

Des colonies bactériennes sont prélevées sur les boîtes de gélose. Chacune des colonies est inoculée dans 5 ml de milieu LB liquide supplémenté par l'ampicilline (100 µg/ml). Ces échantillons sont incubés à 37°C sous agitation, une nuit.

Un soucier est réalisé, en mélangeant stérilement 700 µl de suspension bactérienne à 300 µl de glycérol et stocké à - 80°C, le reste de la suspension est centrifugé (700 g, + 4°C, 10 min). L'ADN plasmidique contenu dans le culot bactérien est purifié suivant le protocole du kit « High Pure Plasmid Isolation Kit » (Roche).

Une digestion du plasmide recombinant est réalisée par l'enzyme de restriction *Pvu* II ayant un site de coupure unique dans l'insert (en position 347 de l'insert) et 2 sites de coupures dans le plasmide. La taille du fragment caractéristique de l'insertion est de 772 pb si l'ADNc est inséré dans le sens correct, et de 627 pb pour l'insertion « antisens » de l'ADNc.

I – 7 – 2 – 2. Maxipréparation et gigapréparation

Cette technique est utilisée pour la production d'ADN plasmidique en grande quantité ; jusqu'à 8 mg d'ADN peuvent être obtenus par gigapréparation. Les kits utilisés (Qiafilter Endofree de Qiagen) permettent l'élimination des endotoxines présentes dans les échantillons. Les endotoxines sont des composants membranaires des bactéries qui peuvent réduire l'efficacité de transfection, ou entraîner une activation du système du complément chez l'animal.

Une fraction du soucier correspondant au plasmide recombinant (120 µl et 600 µl) estensemencée dans 500 à 2500 ml de milieu LB respectivement pour une maxipréparation et une gigapréparation, en présence d'ampicilline (100 µg/ml). L'ensemble est incubé une nuit à

37°C sous agitation. Le protocole appliqué pour l'isolement de plasmide est celui du kit. La pureté des ADN extraits suivant ces préparations permet de les utiliser soit pour la transfection de cultures cellulaires soit pour les complexer à des liposomes cationiques.

II. Culture cellulaire

II – 1. Culture de la lignée cellulaire d'ostéosarcome 1547

Les cellules d'ostéosarcome utilisées (CRL 1547) proviennent de l'ATCC. Elles sont issues de la transformation par 0,01 ml MNNG (N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, nitrosamine cancérigène) d'une autre lignée cellulaire osseuse HOS (ATCC CRL-1543). Cette lignée est capable de produire des tumeurs ostéogéniques chez la souris « nude ».

Les cellules adhérentes sont cultivées dans du milieu « Minimum Essential Medium » (MEM, Invitro) contenant 25 mM d'HEPES. Le milieu est supplémenté par 2 mM de L-glutamine, 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau foetal (BioWhitaker, Verviers ; Belgique) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min. Ces cellules sont cultivées dans un incubateur thermostaté à 37°C, dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours.

A confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire lavé par un tampon phosphate stérile (PBS 1X : NaCl 1,38 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 31 mM, KH₂PO₄ 14,7 mM, pH 7.4). Les cellules sont détachées de leur support par incubation de 5 min avec une solution de trypsine-EDTA (Invitrogen). L'action de la trypsine est inhibée par addition de milieu de culture complet, les cellules sont centrifugées (10 min, +4°C, 1200 rpm) puis remises en culture dans du milieu à la densité souhaitée. Les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'une cellule de Malassez. Le pourcentage de viabilité est estimé par le test d'exclusion au bleu trypan.

II – 2. Culture de la lignée cellulaire endothéliale bovine (EJG)

Les cellules endothéliales capillaires utilisées (CRL 8659, EJG) proviennent également de l'ATCC. Cette lignée dérive du tissu médulo-surrénal bovin dissocié par la collagénase. Le milieu de culture des cellules endothéliales est le même que celui utilisé pour les cellules 1547, supplémenté en acides aminés non essentiels à 1% (Invitrogen).

La culture de routine et la numération sont effectuées par les mêmes méthodes et dans les mêmes conditions que pour les cellules d'ostéosarcome. Pour les expérimentations, du b-FGF est ajouté à raison de 6ng/ml, au milieu de culture des cellules EJG.

II – 3. Culture de la lignée cellulaire humaine HUVEC

Les cellules HUVEC proviennent de la firme Clonetics (Walkersville, U.S.A.). Ces cellules primaires d'origine humaine sont isolées de la veine ombilicale. Elles sont maintenues en culture dans du milieu spécifique : Endothelial Growth Medium (milieu EGM, Clonetics contenant du b-FGF, « human Epidermal Growth Factor » (h-EGF), VEGF (chacun à 12 ng/ml), gentamicine : 100 U/ ml, amphotéricine B, 100 U/ ml, SVF 2%). Ces cellules sont cultivées dans un incubateur thermostaté à 37°C, dans une atmosphère humide (95%), à 5% de CO₂. La culture de routine et la numération sont effectuées par les mêmes méthodes et dans les mêmes conditions que pour les cellules 1547 et EJG.

II – 4. Coculture verticale de cellules 1547 et EJG

Afin de démontrer que la protéine codée par les plasmides recombinants est fonctionnelle et possède une activité inhibitrice sur la prolifération des cellules endothéliales, des expériences de coculture verticale sont réalisées. Le principe et le déroulement de la coculture verticale sont résumés dans la Figure M3.

Le milieu de culture des cellules 1547 électroporées comportant un antibiotique de sélection, une phase de pré-culture est réalisée au cours de laquelle les cellules 1547 sont maintenues dans le milieu des cellules EJG sans antibiotique.

Les cellules EJG sontensemencées en plaque 24 puits à la densité de 10 000 cellules/cm², au temps T0 et maintenues dans les conditions de culture normales durant 48 h.

Les cellules 1547 sontensemencées dans les inserts de coculture (Tissue Culture Inserts membrane de polycarbonate 0,4 µm, Nunc) à la densité de 3000 cellules/cm², dans 0,5 ml de milieu de culture 24 h après les cellules EJG. Pendant 24 heures, les cellules 1547 adhèrent sur leur support, puis les inserts sont placés au contact des cellules EJG. La coculture est poursuivie pendant 13 jours, le milieu de culture est changé par aspiration tous les deux ou trois jours. Les cellules 1547 arrivant à confluence après 5 jours de culture, les cupules sont remplacées tous les 4 jours par de nouveaux inserts contenant des cellules 1547 confluentes à 25%.

Des comptages des cellules EJG sont effectués tous les 2/3 jours. La mortalité est déterminée par le test d'exclusion au bleu trypan.

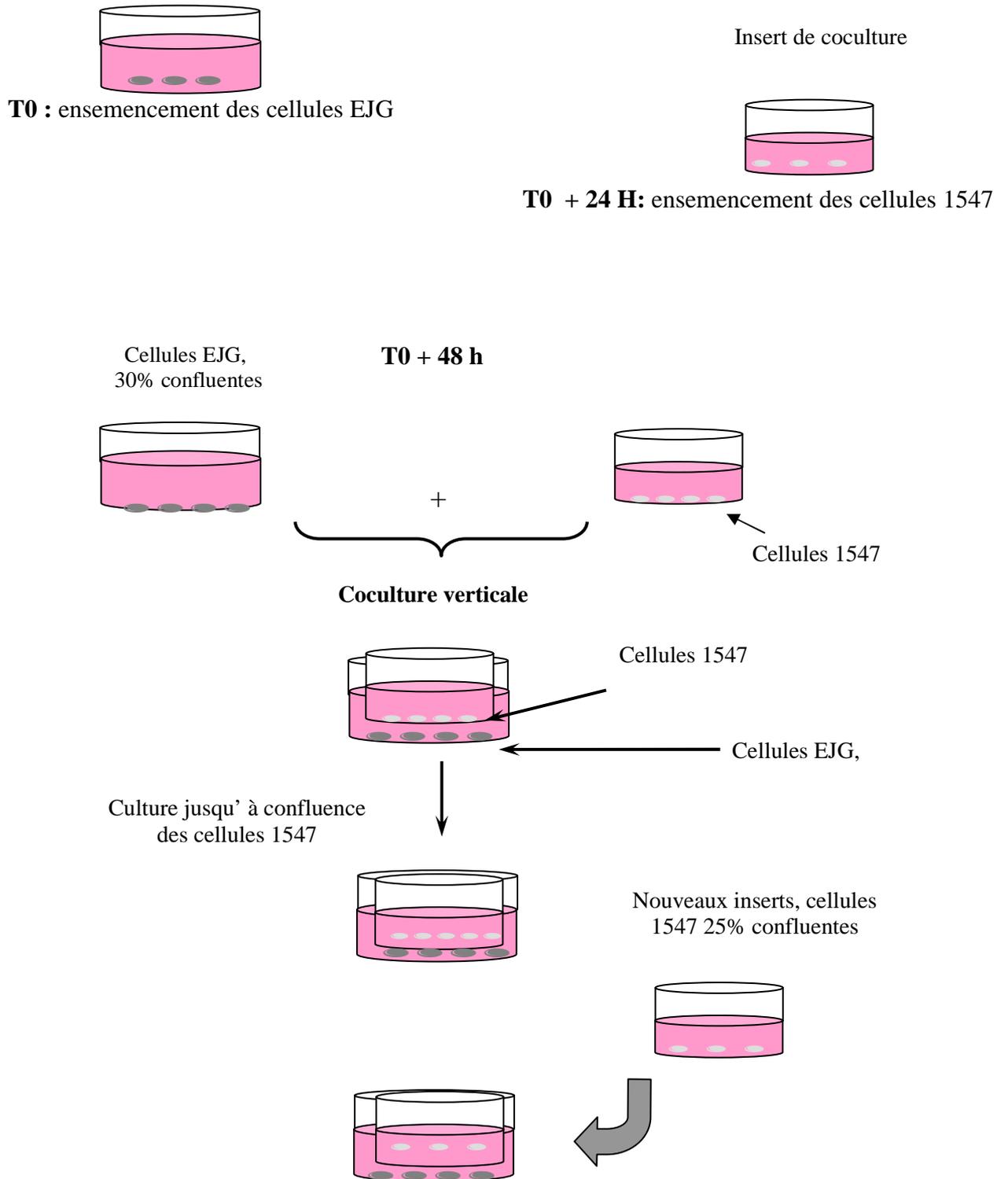


Figure M3 : Principe de la coculture verticale.

II – 5. Courbes de croissance

La croissance des cellules est déterminée sur une durée de 6 à 15 jours. Les différentes lignées cellulaires sontensemencées dans des plaques 24 puits avec 1 ml de milieu, à une densité de 5000 cellules/cm², pour les cellules 1547, et de 10000 cellules/cm² dans le cas des cellules EJM. Une numération quotidienne pour les cellules 1547, et tous les 2/3 jours pour les cellules EJM est effectuée comme suit : le tapis cellulaire est lavé par une solution de PBS, puis soumis à l'action de la trypsine (100µl/puits). Les cellules sont ensuite reprises dans du milieu complet et centrifugées. Le culot cellulaire est remis en suspension dans un volume de milieu approprié. Par puits, quatre aliquotes de 50 µl sont prélevées et mélangées à 50 µl de bleu trypan. La numération est effectuée à l'aide d'une lame de Malassez, le nombre de cellules par cm² est obtenu à l'aide de la formule suivante :

$$N \text{ (Nombre de cellules par cm}^2\text{)} = \frac{\text{(Nombre de cellules excluant le bleu trypan} \times \text{D (dilution des cellules dans le Bleu trypan))}}{1,88 \text{ (surface du puits en cm}^2\text{)}}$$

Cette méthode de comptage est également utilisée afin d'apprécier la croissance des cellules après transfection par les gènes d'intérêt (TnI et endostatine). Un comptage en dix exemplaires est réalisé. Une analyse statistique des résultats est réalisée par application du test de Student.

II – 6. Courbes de cytotoxicité

C'est une méthode d'analyse de prolifération cellulaire qui repose sur la réduction d'un sel de tétrazolium, le 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) par les mitochondries des cellules vivantes. Ce test est utilisé afin de comparer les vitesses de prolifération des cellules 1547 (parentales et transfectées) et des cellules EJM.

Les différentes lignées cellulaires sont ensemencées en plaque de culture 96 puits et maintenues dans des conditions de culture standard. La viabilité cellulaire est déterminée tous les jours comme décrit ci dessous.

Une solution de MTT (0,5 mg/ml) est incubée avec les cultures 3 h à 37°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. La solution de MTT est ensuite éliminée et remplacée par 100 µl de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Sigma). Les plaques sont ensuite incubées 10 min à 37°C, sous agitation, afin de solubiliser les cristaux de formazan « synthétisés ». La mesure de la densité optique est effectuée à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique (Labsystems Multiscan® bichromatic) à la longueur d'onde de 540 nm (Mosmann *et al.*, 1983). Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition de croissance} = (1 - [\text{DO traitée} / \text{DO témoin}]) \times 100$$

III. Transfection des cellules

III – 1. Electroporation

III – 1 – 1. Préparation des constructions plasmidiques

Les plasmides pSecTag2, pSecEndo et pSecTnITag sont digérés par l'enzyme de restriction Pvu I (10 U/µg de plasmide) pendant 1 h à 37°C. Cette enzyme est choisie de manière à couper une seule fois les plasmides dans le gène de résistance à l'ampicilline.

Les plasmides linéarisés sont précipités, lavés puis séchés en conditions stériles. Les culots sont repris stérilement dans 20 µl d'eau distillée stérile, puis dosés par spectrophotométrie.

III – 1 – 2. Transfection par électroporation

Cette méthode est utilisée pour la transfection des cellules 1547 par le plasmide pSecTag2, pSecEndo ou pSecTnITag. Le principe de l'électroporation est de soumettre les cellules en suspension à un champ électrique durant une courte période ou « pulse ». Le champ électrique conduit à la formation transitoire de pores membranaires au niveau desquels les plasmides peuvent pénétrer dans la cellule.

Les cellules en phase exponentielle de croissance sont trypsinées et comptées. Dans une cuve à électroporation, on dépose : 20 µg d'ADN plasmidique préalablement linéarisé, et 400 µl de suspension cellulaire à $1 \cdot 10^6$ cellules/ml contenant du glucose 10 mM et du dithiothréitol (DTT) 0,1 mM. Le mélange est homogénéisé et incubé 5 min à température ambiante. La suspension est ensuite soumise à un choc électrique de 240 V, d'intensité 1050 µF pendant une durée de 30 ms (électroporateur Easyject Plus, Equibio, Angleur, Belgique). Les cellules sont alors transférées dans un flacon de culture contenant du milieu complet et sont incubées 48 h à 37°C, avec 5% de CO₂. La sélection est réalisée par ajout de 400 µg/ml de zéocine (Invitrogen) au milieu complet.

III – 1 – 3. Isolement de clones cellulaires

Après une semaine de sélection, les cellules transfectées sont décollées par action de la trypsine et ensemencées à une densité de 2000 par boîte de culture de 100 mm contenant du milieu complet et de la zéocine (400 µg/ml). Le milieu est renouvelé tous les deux jours jusqu'à apparition des clones. Ceux-ci sont repérés à l'aide d'un objectif de marquage et isolés par un cylindre creux. Les cellules sont décollées par addition de trypsine dans le cylindre et incubation de 15 min à 37°C. Les cellules récupérées dans chaque cylindre sont ensemencées dans des plaques 96 puits à raison d'un clone par puits. A confluence, les clones sont trypsinés et transférés en plaque 24 puits contenant du milieu complet et le facteur de

sélection. L'expression des gènes antiangiogéniques peut être étudiée sur chaque clone ainsi isolé.

II – 1 – 4. Vérification de l'intégration des plasmides

II – 1 – 4 – 1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) est extrait des clones cellulaires suivant le protocole « Tripure Extraction Reagent » (Roche) afin de montrer l'intégration des plasmides recombinants dans les cellules transfectées.

Les cellules sont lysées dans la solution de Tripure (1ml/5.10⁶ cellules) et incubées 5 min à température ambiante pour dissocier les complexes nucléoprotéiques. Après addition de chloroforme, (0,2 ml/ml de Tripure), les échantillons sont centrifugés. L'ADNg contenu dans la phase organique inférieure et dans l'interphase est précipité par de l'éthanol absolu (0,3ml /ml de Tripure). Le culot d'ADN récupéré après centrifugation est lavé trois fois dans de l'éthanol 10% contenant 0,1 M de citrate de sodium puis une fois dans de l'éthanol 75%. Une fois séché le culot est repris dans 100 µl de NaOH 8 mM. Le pH de cette solution est ajusté à 8,4 par addition de 66 µl d'HEPES 0,1 M. Les ADNg ainsi extraits serviront de matrice pour la réaction de PCR.

II – 1 – 4 – 2. Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR

Les amorces sont choisies afin de vérifier la présence des constructions plasmidiques codant pour l'endostatine ou la TnI. Dans les deux cas, l'amorce sens est située sur le vecteur et l'amorce antisens est spécifique de la séquence codante de l'endostatine ou de la TnI. Les séquences nucléotidiques de ces amorces ainsi que la taille des fragments amplifiés sont présentées dans le tableau M3.

	Troponine I	Endostatine
matrice	ADNg	ADNg
Amorce sens	5'TAATACGACTCACT ATAGGG3'	5'AATTCATGGAGAC AGACACACTCC3'
Amorce antisens	5'GGACTCGGACTCAA ACAT3'	GATCCGTTTGGAGA AAGAGGTCAT
Taille du fragment amplifié	784 pb	631 pb

Tableau M3 : récapitulatif des amorces PCR utilisées pour les vérifications de l'intégration des constructions plasmidiques.

Cinq cent ng d'ADN plasmidique extraits des différents types cellulaires sont soumis aux conditions PCR décrites dans le tableau M4.

Matrice De PCR	Phase	Durée et température	Nombre de cycles
ADNg TnI	Dénaturation	2 min à 94 °C	1
	Hybridation	1 min à 54 °C	} 35
	Extension	2 min à 72 °C	
ADNg Endostatine	Dénaturation	2 min à 94 °C	1
	Hybridation	1 min à 56 °C	} 35
	Extension	1 min à 72 °C	

Tableau M4 : Récapitulatif des programmes PCR utilisés pour amplifier les différents fragments.

Pour ces réactions PCR utilisant l'ADNg comme matrice deux contrôles sont ajoutés :

- un contrôle positif est obtenu par l'amplification d'un plasmide recombinant (contenant la séquence codante de la TnI ou de l'endostatine) purifié, parallèlement à l'amplification de l'ADNg.

- un contrôle négatif obtenu par l'amplification d'un plasmide vide parallèlement à l'amplification de l'ADNg.

La PCR effectuée directement sur les ARN totaux des cellules transfectées permet d'éliminer l'hypothèse d'une contamination de l'échantillon par l'ADNg ou par du plasmide resté sous forme épisomale.

Les produits de l'amplification sont déposés sur un gel d'agarose 0,8% et observés après exposition aux UV.

III – 2. Transfection par FuGENE 6

Le FuGENE 6 (Roche) est un composé lipidique, non liposomal, qui permet d'incorporer l'ADN plasmidique circulaire dans de nombreuses lignées de cellules eucaryotes, avec une grande efficacité. La transfection réalisée par le FuGENE6 sur les cellules endothéliales est transitoire. La préparation du mélange FuGENE 6/ADN plasmidique est réalisée selon le protocole du fabricant, en utilisant 1µg de plasmide pour 2µl de FuGENE6.

Le mélange est déposé goutte à goutte sur les cellules dans le milieu de culture. Les cellules sont maintenues dans des conditions de culture habituelles durant 48 h. Une analyse de l'expression de la protéine par les cellules transfectées est ensuite effectuée.

Pour ces expériences de transfection, les cellules sontensemencées, 48h avant la transfection, sur lamelles couvre-objet en plaque de culture 24 puits, à une densité de 10000 cellules/cm². La transfection par le FuGENE 6 est réalisée 3 jours après l'ensemencement.

III - 3. Transfection par les complexes liposomes cationiques/ADNc

Les liposomes marqués à la rhodamine (LiporedTM) et les complexes de liposomes cationiques /ADN plasmidique, que nous nommons lipoplexes, utilisés au cours de ce travail sont formulés par la société Munich Biotech AG (Munich, Allemagne).

III – 3 – 1. Préparation des lipoplexes

Les liposomes sont préparés suivant la technique de film lipidique. Les lipides, DOTAP et cholestérol sont dissous dans du chloroforme et évaporés jusqu'à former un film lipidique qui est séché sous vide (pression de 3 à 5 mbar) à 40°C durant 60 min. Les lipides sont alors resuspendus dans un volume adéquat de glucose à 5% formant une solution de vésicules lipidiques multilamellaires. Ces vésicules sont soumises à extrusion à travers une membrane de taille appropriée (entre 100 et 400 nm). Les lipoplexes sont réalisés en mélangeant vigoureusement des volumes égaux de liposomes cationiques préalablement préparés et la suspension d'ADN plasmidique. La concentration finale en ADN dans les lipoplexes est de 0,1 µg/µl.

Une vérification de la qualité de la complexation des ADN plasmidiques aux liposomes cationiques est effectuée en dénaturant ces lipoplexes 5 min à température ambiante en présence de SDS 10 mM et d'acétonitrile 0,3 M. La dénaturation des lipoplexes est visualisée sous UV après électrophorèse en gel d'agarose 1% (en tampon TAE 1X).

Trois types de lipoplexes sont synthétisés avec les ADN plasmidiques pSecTag2C, PSecEndo et pSecTnITag et dénommés : lipoplexes/pSecTag2, lipoplexes/pSecEndo et lipoplexes/pSecTnITag.

Les solutions de lipoplexes et liposomes sont conservées à + 4°C. La suspension est homogénéisée de manière stérile juste avant emploi puis utilisée directement pour transfecter les cellules en culture, ou administrée aux animaux au cours de la phase expérimentale *in vivo*.

III – 3 – 2. Transfection par les lipoplexes

Les cellules à transfecter sontensemencées en plaque 24 puits. Après un temps d'adhésion de 24 à 48 h le milieu de culture est aspiré et les cellules lavées par une solution de PBS 1X. Du milieu de culture sans sérum de veau est ajouté dans chaque puits. La suspension de liposomes ou de lipoplexes est dispensée goutte à goutte dans chaque puits. Les cellules sont placées 1 h dans l'incubateur à 37°C, 5% de CO₂. Au terme de cette incubation, le milieu de transfection est aspiré, le tapis cellulaire soigneusement lavé par la solution de PBS 1X, et du milieu de culture complet est ajouté dans chaque puits. Les cellules sont ensuite cultivées normalement et la viabilité cellulaire est appréciée par le test au bleu trypan, à divers temps après la transfection.

IV. Techniques de détection de l'expression des protéines

Deux méthodes sont utilisées afin de mettre en évidence l'expression de la troponine I et de l'endostatine à partir des cellules transfectées de manière stable ou transitoire.

IV – 1. Western blot

IV – 1 – 1. Migration des protéines en SDS-PAGE

IV – 1 – 1 – 1. Préparation des échantillons

Les cellules récupérées par trypsination sont centrifugées (250 g, 10 min, + 4°C). Les culots cellulaires sont resuspendus dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM, Deoxycholate 1%, Nonidet P40 1%, SDS 0,1%, NaCl 150 mM, Aprotinine 20 µg/ml), à raison de 1.10⁶/ml. Les

échantillons sont homogénéisés par pipetages successifs puis centrifugés à 5000 g et 4°C pendant 20 min, et le surnageant contenant les protéines cellulaires totales est récupéré.

Les protéines cellulaires contenues dans les échantillons sont dosées selon la méthode colorimétrique de Lowry.

IV – 1 – 1 – 2. Electrophorèse

Les échantillons protéiques sont dilués ½ dans du tampon échantillon 2X (Tris HCl 0,4 M, pH 6,8 ; SDS 4,5% glycérol 4,5%, bleu de bromophénol 2 mM) additionné de β -mercaptoéthanol (0,6 M). Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C durant 5 min, et séparées par migration en SDS-PAGE (« Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel »).

Des aliquotes de protéines totales cellulaires (40 μ g) sont déposées sur un gel de polyacrylamide à 12,5% constitué d'un gel de concentration à 3 % d'acrylamide/bisacrylamide. L'électrophorèse des protéines est effectuée à 60 mA dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,5). Des standards protéiques de masse moléculaire connue (Invitrogen) sont également déposés afin d'étalonner la migration des protéines et d'estimer leur masse moléculaire.

IV – 1 – 2. Technique du Western blot

IV – 1 – 2 – 1. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le gel est utilisé pour un électrotransfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (Amersham, Orsay, France). En fin d'électrophorèse, la membrane, les feuilles de papier Whatman et les éponges de mousse sont lavées 5 min dans de l'eau distillée, équilibrées pendant 15 min. dans le tampon de transfert (Tris 50 mM, glycine 383,5 mM, méthanol 20%, SDS 0,1% ; pH 8,1-8,5). Le montage est effectué et disposé dans une cuve de transfert et

immergé dans le tampon de transfert. Le transfert des protéines sur la membrane s'effectue à 100 V, 2 h, à 4°C sous agitation magnétique.

IV – 1 – 2 – 2. Incubation avec les anticorps

Après transfert des protéines, la membrane est lavée deux fois 10 min dans le PBS (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 17 mM, NaCl 68 mM, pH 7,4) incubée dans du tampon de blocage (PBS, Tween-20 0,05 %, lait écrémé 3 %) afin de bloquer les sites de liaison non spécifiques. La membrane est lavée avant d'être incubée sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (anti c-Myc (Invitrogen) pour la détection de la troponine ou anti-endostatine (Serotec, Oxford, UK) dilué 1/400 dans le tampon de blocage. Une seconde série de lavage précède la seconde incubation (1 h, à température ambiante) avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (dilution 1/1000 dans le tampon de saturation). L'anticorps secondaire est un anticorps anti-IgG de mouton couplé à la HRP (« horseradish peroxidase », SIGMA-Aldrich). La membrane est de nouveau lavée (Tampon de lavage : PBS, Tween-20 0,1 %, BSA 0,5 %, lait écrémé 1 %) puis rincée 5 min avant d'être révélée.

IV – 1 – 2 – 3. Réaction de chimioluminescence

La membrane est séchée rapidement sur du papier absorbant, incubée avec la solution de détection par chimioluminescence du kit ECL (Amersham) pendant 1 min sous agitation puis enveloppée dans du papier film transparent. Elle est alors exposée à un film radiographique (Amersham) pendant une durée allant de 30 s à 20 min. Les films sont révélés par un développeur automatique (Kodak diagnostic Imaging, RP X-OMAT processor modèle M6B).

IV – 2. Détection in situ des protéines par immunofluorescence

La détection de l'expression de protéines, *in situ*, peut être effectuée sur des cellules en culture. Cette technique nécessite un anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée, c'est à dire de l'endostatine ou de la protéine de fusion c-Myc/TnI.

Les clones sont ensemencés sur lamelles rondes en plaque 24 puits contenant 1 ml milieu complet additionné de zéocine. Les cellules sont lavées au PBS puis fixées par incubation dans du méthanol 5 min à température ambiante. Les interactions non-spécifiques, entre l'anticorps primaire et diverses protéines, sont diminuées en incubant les cellules 20 à 30 min en présence de 2 ml de solution de blocage (PBS 1X supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal). Les cellules sont ensuite mises au contact 1 h à température ambiante avec l'anticorps primaire dilué au 1/500 dans la solution de blocage. Après une étape de lavage par une solution de PBS 1X, les lames sont incubées 1 h à température ambiante et à l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire, une IgG de chèvre anti-souris couplé à la FITC (Isothiocyanate de Fluorescéine) (Molecular Probes, Leiden, Pays Bas). Cet anticorps, dilué au 1/500 dans la solution de blocage, est déposé en présence de bleu Evans (dilution 1/1000), permettant de contre-colorer les cellules en rouge. En effet, les cellules possèdent une fluorescence verte naturelle qui interfère avec la fluorescence FITC. La fluorescence est visualisée sous microscopie à fluorescence FITC.

V. Détection de l'apoptose cellulaire

V – 1. Analyse des modifications de morphologie cellulaire

Les cellules sontensemencées à une densité de $5.10^3/\text{cm}^2$ et cultivées en plaque 24 puits à 37°C -5% CO_2 pendant 24 h. Les différents lipoplexes sont testés sur les cultures cellulaires. Le milieu est éliminé 18 à 36 h après la transfection, et le tapis cellulaire lavé par une solution de PBS. Les cellules sont fixées par une solution contenant 1% de formaldéhyde et 0,2% de glutaraldéhyde pendant 5 min à température ambiante. Le tapis cellulaire est lavé deux fois par une solution de PBS et les cellules sont montées entre lame et lamelle avec de « l'Immun-mount ». Une observation de la morphologie cellulaire est effectuée en microscopie optique à contraste de phase.

V – 2. Double coloration nucléaire DAPI et T.U.N.E.L.

Les noyaux des cellules apoptotiques sont marqués à la fois par le DAPI et par la technique T.U.N.E.L.

Les cellules sontensemencées sur des lamelles de culture à la densité de 5.10^3 cellules/ cm^2 et cultivées pendant 48 h à 37°C en atmosphère humide avec 5 % de CO_2 . Les cellules sont transfectées à l'aide des différents lipoplexes comme décrit précédemment. Les cellules sont lavées avec du PBS, puis fixées avec une solution de paraformaldéhyde 4% (avec du PBS, pH 7,4), 30 min à température ambiante. La mise en évidence de l'apoptose dans les cellules par la technique de T.U.N.E.L. est basée sur le clivage de l'ADN génomique en fragments de différentes tailles. La technique utilisée repose sur l'incorporation dans l'ADN, au niveau des cassures (« Nick »), de nucléotides marqués à la fluorescéine par une enzyme spécifique, la « Terminal deoxynucleotide Transferase » (TdT). Le marquage

T.U.N.E.L. est réalisé suivant le protocole « In situ cell death detection Kit Fluorescein » (Roche). Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) est un agent intercalant de l'ADN. Il colore les noyaux de toutes les cellules. Il est utilisé pour l'observation des noyaux des cellules en apoptose permettant de visualiser des formes fragmentées (condensation du noyau). Les cellules sont ensuite lavées par une solution de PBS 1X puis colorées par une solution de DAPI (0,7 μ M dans le PBS) pendant 5 min à température ambiante. Après trois lavages successifs au PBS, les lamelles sont montées sur des lames avec de « l'Immun-mount » et sont analysées en microscopie à fluorescence

VI. Essai de thérapie génique chez des rats porteurs d'ostéosarcome

VI – 1. Ostéosarcome greffable du rat

L'efficacité de la thérapie génique antiangiogénique, utilisant les gènes de l'endostatine et de la troponine I est évaluée sur un modèle d'ostéosarcome greffable de rat. Ce modèle a été établi par le Pr. Thierry (Jasmin *et al.*, 1982) à partir d'un modèle de sarcome radio-induit chez le rat par injection de colloïde d'hydroxyde de cérium radioactif ^{144}Ce (Allouche *et al.*, 1980; Hernigou *et al.*, 1987).

Ce sarcome ostéogène est très semblable à l'ostéosarcome humain par sa nature ostéogène, son agressivité locale (destruction de la corticale, envahissement des tissus mous), sa capacité à former des métastases pulmonaires et son métabolisme calcique (Mazabraud *et al.*, 1982). Cette tumeur peut être greffée en position intra-osseuse ou para-osseuse, mais elle peut être aussi sous cutanée au niveau du flanc. Le caractère plus ou moins ostéogène de cette tumeur dépend essentiellement du lieu d'implantation : la tumeur est plus ostéogène lorsqu'elle est introduite en position para-tibiale que sous cutanée.

VI – 2. Greffe tumorale

Dans notre travail, les greffes tumorales sont réalisées en position para-osseuse, à partir de fragments congelés ou directement prélevés sur une tumeur d'un animal donneur. Dans les deux cas, le déroulement de l'opération est le même.

VI – 2 – 1. Préparation des fragments tumoraux

L'animal porteur de tumeur est sacrifié à l'éther, la suite de la procédure est effectuée sous hotte de culture cellulaire dans des conditions stériles. La peau de la patte porteuse de tumeur est désinfectée par de l'éthanol 70% puis retirée. La tumeur est disséquée en fragments de 6-8 mm³. Les fragments utilisés pour la greffe sont prélevés dans une région hyperproliférative et hautement ostéogénique de la tumeur et transférés stérilement dans des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture DMEM complet. Le tissu tumoral ainsi récupéré peut être utilisé directement pour la greffe sur de nouveaux animaux ou être congelé et conservé à – 80°C jusqu'à leur utilisation.

VI – 2 – 2. Greffe

La greffe tumorale est effectuée sur des rats Sprague-Dawley (Elevage Depré, St Douchard, France) âgés de trois à quatre semaines, à partir de fragments congelés ou issus de la tumeur d'un animal donneur.

Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sur des animaux maintenus sous anesthésie générale, par un mélange gazeux (O₂/Isoflurane (1-chloro-2,2,2,-trifluoroéthyl difluorométhyl ether)) dispensé au moyen d'un appareil anesthésique spécialement conçu pour les petits animaux (Minerve, France). Le ratio de gaz administré est ajustable suivant

l'âge et le poids de l'animal. La greffe tumorale est effectuée dans des conditions opératoires standard de stérilité et de sécurité.

La patte postérieure droite de l'animal est épilée puis désinfectée par de l'éthanol à 70%. Une incision latérale est effectuée exposant le tibia. Après abrasion du périoste, un fragment tumoral est déposé au contact de la face interne de l'os. L'incision est refermée. Tout au long de l'opération, les fragments tumoraux sont conservés, sur glace, dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture DMEM. Lorsque la greffe est effectuée à partir de tissu frais le pourcentage de prise tumorale atteint 70 – 80% et n'est plus que de 50% lorsque l'opération est réalisée à partir de tissu congelé.

VI – 3. Diagnostic et suivi

VI – 3 – 1. Examen clinique

Une observation macroscopique et une palpation quotidienne de la patte du rat opéré nous permettent de nous assurer de la prise du greffon tumoral. La durée nécessaire pour pouvoir détecter avec certitude une tumeur est d'environ 10 à 12 jours après la greffe. La tumeur atteint alors une taille de 0,6 à 1 cm de diamètre, et ne régresse pas spontanément. Tout au long du traitement, la progression de la surface tumorale est appréciée par mesure de la tumeur selon deux axes perpendiculaires et le volume calculé par application de la formule de Carlsson, où la tumeur est associée à une ellipse (Carlsson *et al.*, 1983) :

$$V = a \times b^2 \times 0,5$$

Dans cette formule, a est le plus grand axe mesuré et b le plus petit.

VI – 3 – 2. Imagerie médicale

VI – 3 – 2 – 1. Tomoscintigraphie au ^{18}F FDG

VI – 3 – 2 – 1. Principe

Cette technique d'imagerie est basée sur la différence de consommation de glucose entre les tissus sains et tumoraux. Cette technique d'imagerie fonctionnelle et métabolique a l'avantage de permettre le suivi *in vivo* d'un même sujet tout au long de l'étude. Elle permet de distinguer les régions tumorales à forte activité métabolique (régions hyperprolifératives) et les zones nécrotiques. Cette technique est la plus sensible et la plus précoce pour évaluer la réponse thérapeutique car les modifications morphologiques apparaissant après les modifications métaboliques.

VI – 3 – 2 – 2. Déroulement de l'examen

Le rat, laissé à jeun 6 à 8 h avant l'expérience, est anesthésié par un mélange O_2 /Isoflurane à 3% et reçoit une injection intraveineuse (au niveau de la veine caudale) de 18,5 à 74 MBq (0,5 à 2 mCi) de ^{18}F FDG (Flucis – Cis bio international, Gif sur Yvette, France). La fixation de ^{18}F FDG par la tumeur est relativement constante après 2 h et durant 6 h après l'administration du radiotraceur. Au terme de ce laps de temps, le rapport signal sur bruit de fond est amélioré sans perte de la qualité de détection compte tenu des doses injectées afin de réaliser une quantification plus reproductible (élimination de la radioactivité dans les urines). L'animal est de nouveau anesthésié 6 h après l'injection de ^{18}F FDG et pendant l'acquisition des images sous la caméra. Les acquisitions sont effectuées sur une gamma caméra double tête à cristaux d'iodure de sodium, équipée d'un système de détection des coïncidences (Axis, Picker, USA). Les données recueillies sont analysées sans correction d'atténuation et les images sont reconstruites en utilisant une méthode itérative (EMML: 20 itérations) et présentées en coupes de 2,1 mm d'épaisseur dans les trois axes.

La quantification tumorale de la fixation de ^{18}F FDG est définie comme étant la radioactivité détectée dans une région d'intérêt dessinée sur la tumeur sur une coupe frontale de 50 mm d'épaisseur (incluant la totalité de l'animal). La fixation tumorale est représentée par le rapport de la radioactivité mesurée dans la région d'intérêt (ROI) au niveau de la tumeur rapportée à la radioactivité totale (de tout le corps) mesurée sur la coupe. La fixation tumorale est exprimée en pourcentage de la fixation totale.

% de fixation tumorale de ^{18}F FDG = radioactivité tumorale / radioactivité totale.

VI – 3 – 2 – 2. Angioscintigraphie au $^{99\text{m}}\text{Tc}$

VI – 3 – 2 – 2 – 1. Principe

Les effets de la thérapie antiangiogénique sur la vascularisation tumorale sont appréciés en cours de traitement par angioscintigraphie au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Cette technique d'imagerie permet d'étudier la vascularisation d'un tissu de manière indirecte après marquage *in vivo* des globules rouges du rat.

Les globules rouges marqués au $^{99\text{m}}\text{Tc}$ après tannage par pyrophosphate sont uniformément répartis dans le compartiment sanguin. La radioactivité détectée au niveau d'un organe est proportionnelle à son volume et à l'importance de sa vascularisation. Cette technique d'imagerie non invasive permet un suivi quantitatif de l'évolution de la vascularisation tumorale en réponse au traitement.

VI – 3 – 2 – 2 – 2. Déroulement de l'examen

L'examen d'angioscintigraphie est réalisé après marquage *in vivo* des globules rouges au technétium à l'aide des réactifs Angiocis (Cis bio international). Une solution de pyrophosphate stanneux est préparée suivant les indications du fournisseur afin d'obtenir un marquage optimal des globules rouges du rat soit 3 à 75 μg de pyrophosphate stanneux dilué

dans 3 ml de sérum physiologique stérile sont injectés via un cathéter dans la veine caudale de l'animal maintenu sous anesthésie. Après un temps de circulation de la solution de 3 minutes, 74 à 111 MBq (2 à 3 mCi) de pertechnate ^{99m}Tc sont administrés par le cathéter. L'examen scintigraphique est réalisé 30 min après cette injection, l'animal maintenu sous anesthésie durant l'acquisition statique de 10 min, réalisé alors que le rat est étendu en procubitus sur la gamma caméra (DSX – Sopa medical, France).

La vascularisation tumorale est définie comme la radioactivité détectée dans la région d'intérêt dessinée sur la tumeur comparée à la radioactivité de la même ROI placée sur la patte opposée dépourvue de tumeur.

Vascularisation tumorale = radioactivité tumorale / radioactivité de la même région controlatérale.

VI – 4. Détection de la distribution des liposomes en microscopie de fluorescence

L'étude de la biodistribution des liposomes cationiques est réalisée dans le but de vérifier le ciblage spécifique des néovaisseaux tumoraux par les liposomes cationiques dans notre modèle expérimental animal. Cette analyse est effectuée sur des rats porteurs de tumeur, trois semaines après l'implantation tumorale. Le déroulement de cette étude est représenté schématiquement sur la Figure M4.

Les animaux maintenus sous anesthésie légère, reçoivent une injection intraveineuse de liposomes cationiques marqués à la rhodamine (5mg/kg) (LiporedTM, Munich Biotech). Afin de pouvoir étudier la répartition des liposomes cationiques dans le réseau vasculaire, une solution de lectine couplée à la FITC (Vector, Burlingame, USA) est administrée 15 min après les liposomes, également par voie intraveineuse. Après une durée de circulation totale des liposomes de 20 min, les rats sont sacrifiés. Les organes des animaux sont fixés *in situ*,

congelés et soumis aux analyses immunohistochimiques. La lectine couplée à la FITC permet de contre colorer tout le réseau vasculaire, alors que la fluorescence rouge due à la rhodamine ne sera visible qu'au niveau des cellules ayant incorporé les liposomes. Une recherche de la colocalisation de la double fluorescence FITC/Rhodamine permet d'étudier la répartition des liposomes dans les différents organes.

La distribution des liposomes est visualisée sous microscopie de fluorescence, utilisant des filtres permettant la détection de la double fluorescence FITC/rhodamine (microscope Axiophot 2, Zeiss, Göttingen, Allemagne).

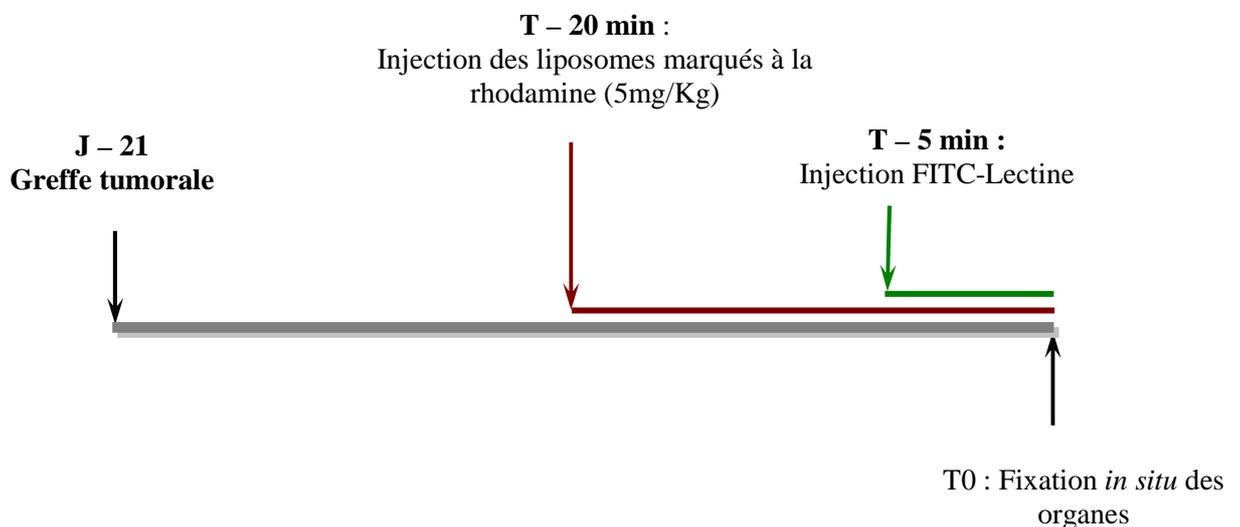


Figure M4 : Etude de la biodistribution des liposomes cationiques après injection par voie intraveineuse

VI – 5. Différents traitements appliqués

Les protocoles appliqués *in vivo* ont pour but de déterminer et de comparer l'efficacité des gènes de la TnI et de l'endostatine dans le traitement de l'ostéosarcome greffable de rat. Ces gènes seront administrés aux animaux sous forme complexée avec les liposomes cationiques (formulés par Munich Biotech AG). Au cours de ces études, les trois types de

lipoplexes synthétisés sont utilisés : Les lipoplexes/pSecTag2 servent de contrôle et permettent d'évaluer une éventuelle interaction du plasmide recombinant dans l'évolution tumorale.

VI – 5 – 1. Traitement intratumoral

Une série de rats est greffée avec des fragments de tumeurs, provenant d'une tumeur fraîche, en position para tibiale comme précédemment décrit. Les rats porteurs d'un ostéosarcome détecté par palpation 10 jours après la greffe tumorale, sont répartis en deux groupes de manière aléatoire. Un lot de rats sera traité par injection intratumorale de lipoplexes/pSecEndo trois fois par semaine, les animaux étant sous anesthésie durant l'injection. L'autre lot reçoit à la même fréquence une injection intratumorale de lipoplexes/pSecTag2. Ce traitement, dont le but est de valider la stratégie de thérapie génique antiangiogénique, est poursuivi jusqu'à involution totale de la tumeur ou sur 8 semaines. Au terme de l'étude, les animaux sont sacrifiés, les organes (tumeurs, poumons, foie) récupérés et soumis à une analyse anatomopathologique.

VI – 5 – 2. Traitement intraveineux

La greffe tumorale est réalisée comme précédemment décrite et les animaux porteurs de tumeur répartis en groupes de manière aléatoire 12 jours après cette opération.

Une première étude ayant pour but de comparer l'activité antiangiogénique *in vivo* des gènes de l'endostatine et de la TnI, est réalisée sur une durée de 12 jours et sur trois groupes de rats. Un groupe recevra les lipoplexes/pSectag2, un autre les lipoplexes/pSecEndo, le troisième sera traité par les lipoplexes/pSecTnITag. Au cours de cette phase expérimentale les

lipoplexes sont administrés par voie intraveineuse (veine caudale) tous les deux jours, la quantité d'ADN administrée est de 240 µg.

Après deux semaines de traitement soit six administrations de lipoplexes, tous les animaux sont sacrifiés, les organes fixés, récupérés et des analyses histologiques sont réalisées afin d'étudier la vascularisation et l'apoptose tumorales.

Dans un second essai, seul l'agent antiangiogénique le plus efficace est utilisé et l'administration intraveineuse des lipoplexes est poursuivie jusqu'à régression des tumeurs ou décès des animaux. Les animaux sont répartis en deux groupes, 12 jours après la greffe tumorale, lorsque la tumeur est détectable par imagerie médicale. Une quantité de lipoplexes correspondant à 240 µg d'ADN plasmidique est alors injectée par voie intraveineuse tous les deux jours aux animaux porteurs de tumeur. L'évolution de la tumeur au cours de ce traitement est suivie par tomoscintigraphie au ^{18}F FDG et angioscintigraphie au $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La Figure M5 présente schématiquement le déroulement de cet essai.

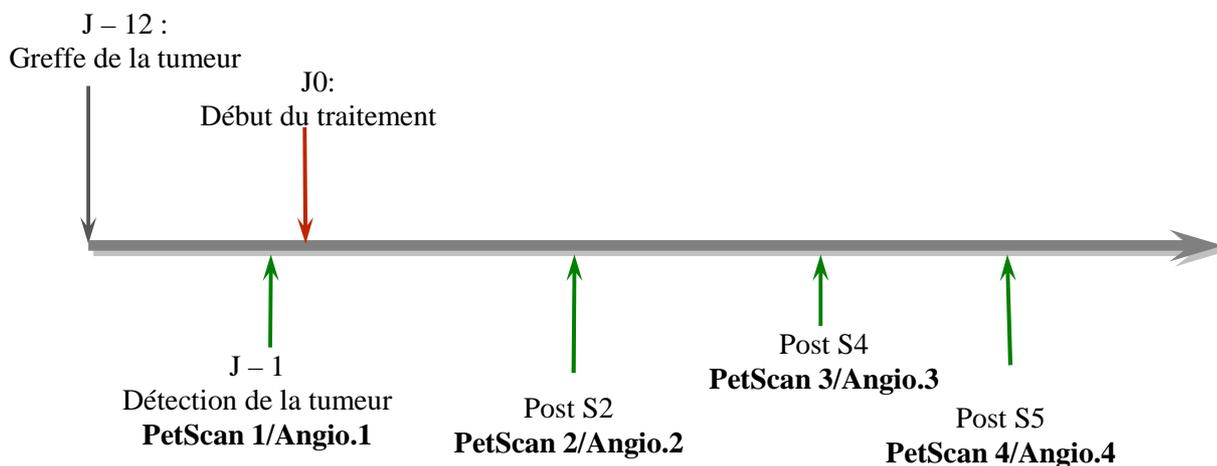


Figure M5 : Administration des lipoplexes par voie intraveineuse et suivi par imagerie médicale : déroulement de l'essai.

Le premier examen d'imagerie médicale est réalisé avant le début du traitement. Les examens sont ensuite réalisés en fin de 2nde semaine de traitement (Post S2), en fin de 4^{ème} et de 5^{ème} semaine de traitement. Le traitement débute à J0 et se poursuit jusqu'à disparition de la tumeur ou décès de l'animal, au rythme d'une injection tous les deux jours. Angio : Angioscintigraphie

Des examens anatomopathologiques sont effectués sur la tumeur, le foie et les poumons de tous les animaux en fin d'expérimentation.

Le tableau M5, récapitule les différents traitements que nous avons appliqués, leur durée et le nombre d'animaux inclus dans chaque groupe.

Groupes d'animaux	Nature du traitement	Nombre d'animaux	Durée du traitement
IT pSecTag2	Lipoplexes/pSecTag2 IT	2	Jusqu' à régression tumorale ou décès de l'animal
IT pSecEndo	Lipoplexes/pSecEndo IT	4	
IV 1 pSecTag2	Lipoplexes/pSecTag2 IV	3	12 jours
IV 1 pSecEndo	Lipoplexes/pSecEndo IV	4	
IV 1 pSecTnITag	Lipoplexes/pSecTnITag IV	4	
IV 2 pSecTag2	Lipoplexes/pSecTag2 IV	3	Jusqu' à régression tumorale ou décès de l'animal
IV 2 pSecEndo	Lipoplexes/pSecEndo IV	6	

Tableau M5: Récapitulatif des traitements et de leur durée d'application

IT : Intratumorale ; **IV** : Intraveineuse

VI – 6. Méthodes d’histologie

VI – 6 – 1. Analyse histologique de la tumeur et des poumons

Les organes prélevés (tumeur, poumons) sont fixés dans du formol à 10% sur la nuit, puis inclus en bloc de paraffine. A partir de ces blocs d’inclusion en paraffine, des coupes de 5 µm sont effectuées au microtome, déparaffinées et traitées par trois colorants différents :

- l’hématéine qui permet la coloration des compartiments cellulaires acidophiles comme les noyaux

- l’hématoxyline qui colore les compartiments éosinophiles et basophiles

- le safran qui permet la visualisation des filaments de collagène

Les lames sont observées en microscopie optique, pour chaque tumeur plusieurs sections sont examinées.

VI – 6 – 2. Analyse de la vascularisation et de l’apoptose tumorale

VII – 6 – 2 – 1. Fixation et cryoconservation des organes

Les organes sont fixés *in situ* par perfusion d’une solution de paraformaldéhyde 1% (40°C, pH 7,4, pression 120 mm Hg) dans la circulation de l’animal anesthésié. Dès que la fixation est réalisée, les poumons sont expansés à leur volume physiologique par injection trachéale d’une solution d’agarose 3% (maintenue dans un bain marie à 40°C). Les organes sont prélevés (tumeur, reins, foie, poumons, muscle, rate) soumis à une post fixation de 3 h dans une solution de paraformaldéhyde 3% à 4°C. Une étape d’incubation dans une solution de sucrose 20% réalisée pendant la nuit a pour but d’assurer une cryoprotection des prélèvements qui sont découpés, inclus dans de l’OCT (« Optimal Cutting Compound », cryomatrix, Shandon, Pittsburgh, USA) et coupées sur un cryostat (2800 Frigocut, Reichert, Jung) en sections de 8 µm qui sont soumises aux analyses histologiques.

VI – 6 – 2 – 2. Détection des vaisseaux tumoraux en immunofluorescence

Les vaisseaux tumoraux sont détectés par une technique d'immunomarquage réalisée sur les cryosections tumorales de 8 μm à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre un marqueur membranaire des cellules endothéliales

Les sections sont prétraitées par une solution de méthanol à -20°C (10 min) afin de dissoudre les lipides membranaires. Les interactions non-spécifiques, entre l'anticorps primaire et diverses protéines, sont limitées par l'incubation des sections 30 min dans une solution de blocage (5% sérum de chèvre dans le tampon phosphate 0,1M). Les lames sont mises au contact de l'anticorps primaire (Mouse anti rat-RECA-1 (Serotec)) dilué au 1/400 dans la solution de blocage, pendant une nuit à 4°C . Les lames sont ensuite lavées avec du PBS et incubées 1 h à l'obscurité en présence de l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine « goat anti mouse IgG secondary antibody » (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) dilué 1/400 dans la solution de blocage.

Les sections sont recouvertes par du milieu de montage Vectashield (Vector) et observées en microscopie de fluorescence.

VI – 6 – 2 – 3. Détection simultanée de la vascularisation et de l'apoptose tumorales

Une détection de l'apoptose tumorale est combinée à une visualisation des vaisseaux tumoraux. Dans ce but, un triple marquage est réalisé sur des sections tumorales congelées de 8 μm d'épaisseur. Cette technique de triple marquage permet de visualiser sur une même section les vaisseaux tumoraux, ainsi que les cellules tumorales ou endothéliales qui subissent l'apoptose. Les vaisseaux tumoraux sont visualisés grâce à l'anticorps RECA-1. Les cellules apoptotiques qu'elles soient tumorales ou endothéliales présentent la double coloration DAPI et T.U.N.E.L.

La préparation des échantillons est identique à celle décrite dans le paragraphe ci dessus.

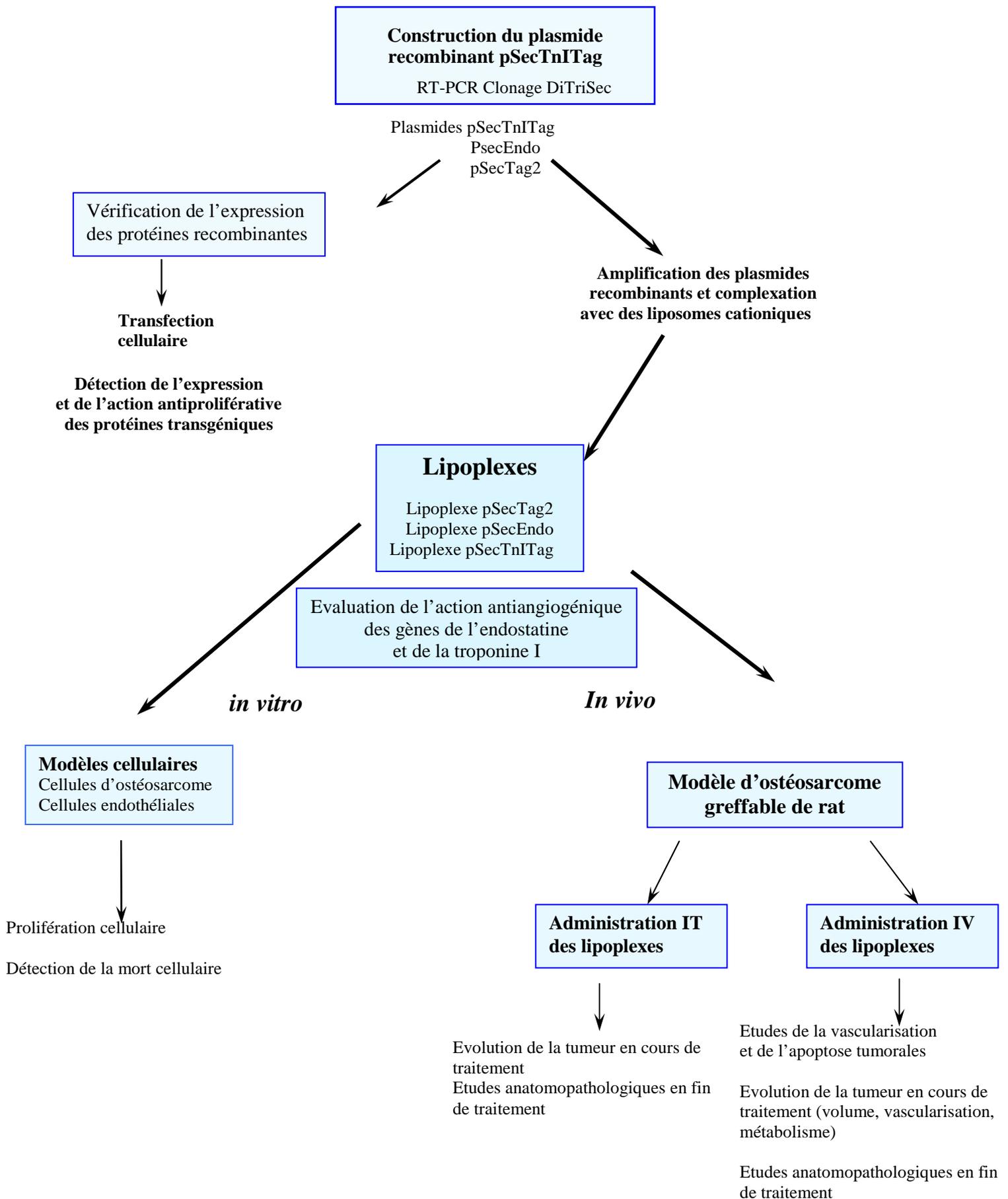
Après incubation avec l'anticorps primaire, les sections sont soumises à la coloration T.U.N.E.L. « In situ cell death detection Kit Fluorescein » (Roche) réalisée selon le protocole conseillé par le fournisseur. Après une étape de lavage au PBS, les sections sont incubées avec l'anticorps secondaire comme précédemment décrit. En dernier lieu, la coloration des noyaux cellulaires par le DAPI (1 µg/ml dans du PBS 1X) est réalisée par incubation des lames 3 min à température ambiante. Les sections sont observées en microscopie de fluorescence, les photos de triple marquage ont été réalisées à l'aide du logiciel Metaview (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Allemagne).

VI – 7. Dosage de l'endostatine circulante après injection intraveineuse des lipoplexes

La concentration d'endostatine circulante est mesurée dans le plasma d'animaux ayant reçu par voie intraveineuse les lipoplexes/pSecEndo et les lipoplexes/pSecTag2

Le plasma de quatre animaux recevant le traitement liposomes cationiques/pSecEndo et des 3 animaux référence est collecté en tube hépariné 24h et 48h après administration du traitement, centrifugé (5000 rpm, 4°C, 10 min) et réparti par aliquotes de 100 µl stockés à – 20 °C jusqu'à leur utilisation. L'endostatine circulante est quantifiée par un dosage immunologique de type E.I.A. à l'aide du kit ACCUCYTE® Mouse Endostatin™ kit (Cytimmune). Les dosage sont effectués en trois exemplaires suivant le protocole établi par le fabricant. Une analyse statistique des résultats est effectuée

RECAPITULATIF DES TECHNIQUES UTILISEES



RESULTATS

Durant les dernières années, une nouvelle approche thérapeutique du traitement du cancer s'est développée : la thérapie antiangiogénique dont le but est de prévenir, ou de ralentir la mise en place de la vascularisation tumorale. Toutefois, un des problèmes rencontrés pour passer au stade thérapeutique est la difficulté d'obtenir au niveau tumoral des taux stables et élevés d'inhibiteurs de l'angiogénèse. Le transfert des gènes codant pour ces agents permettrait de contourner ces limitations ; c'est donc vers une approche de thérapie génique à but antiangiogénique que de plus en plus de groupes s'orientent. Dans cette mouvance, notre travail a eu pour but d'évaluer l'efficacité d'une telle approche thérapeutique appliquée au traitement d'un ostéosarcome de rat.

Au cours de cette étude, l'action antiangiogénique de deux gènes, l'endostatine et la troponine I (TnI), a été évaluée et comparée aussi bien *in vitro* sur des modèles de culture cellulaires qu'*in vivo* sur un modèle d'ostéosarcome greffable de rat. Des liposomes cationiques (DOTAP/Chol) sont choisis comme vecteurs de transfert des gènes. Le choix d'utiliser des liposomes comme vecteurs de l'ADN est fait en gardant à l'esprit que l'objectif final est de pouvoir appliquer cette thérapie à l'homme. Dans cet optique les liposomes cationiques paraissent être des vecteurs plus sûrs et moins immunogènes que les vecteurs viraux.

La première étape a consisté à cloner la séquence codante de la TnI dans un vecteur d'expression plasmidique. La validité des constructions plasmidiques utilisées est vérifiée au cours d'une étude préliminaire. Par validité nous entendons que la transfection de cellule, permet l'expression et la sécrétion de protéines recombinantes, codées par le plasmide, ayant une action antiproliférative sur les cellules endothéliales.

Le potentiel antiangiogénique des ADNc d'endostatine et de TnI est évalué sur des modèles de culture cellulaire, leur capacité à inhiber la prolifération cellulaire est appréciée et comparée

La troisième partie de l'étude a consisté à évaluer et comparer la capacité des constructions plasmidiques codant pour l'endostatine et de la TnI à ralentir la croissance tumorale et prévenir la dissémination métastatique dans le modèle d'ostéosarcome greffable de rat. Nous présentons ici les résultats de ces expérimentations.

I. Construction du plasmide pSecTnITag

I – 1. Isolation de la séquence codante de la TnI

Les ARNm sont extraits à partir d'un fragment de muscle squelettique. Le tissu musculaire provient d'une biopsie obtenue au cours d'une intervention chirurgicale, avec le consentement du patient.

La RT-PCR est réalisée à partir de ces ARN totaux en présence de deux amorces spécifiques de la troponine I musculaire (TnI) et nommées TnI sens et TnI antisens. Ces amorces sont choisies de manière à amplifier de façon spécifique la séquence codante de la TnI et à la cloner dans le vecteur plasmidique pSecTag2.

Le produit amplifié par PCR est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Un signal d'amplification unique de 552 pb, est obtenu dans les pistes 5 à 9, correspondantes aux échantillons biologiques (Figure R1). Ce signal correspond à la séquence codante de la TnI modifiée à l'aide des amorces spécifiques. Le signal observé dans la piste 3 correspondant au contrôle positif de la RT, il indique que la réaction de PCR s'est déroulée correctement et l'absence de signal dans la piste du contrôle négatif confirme la spécificité de la réaction.

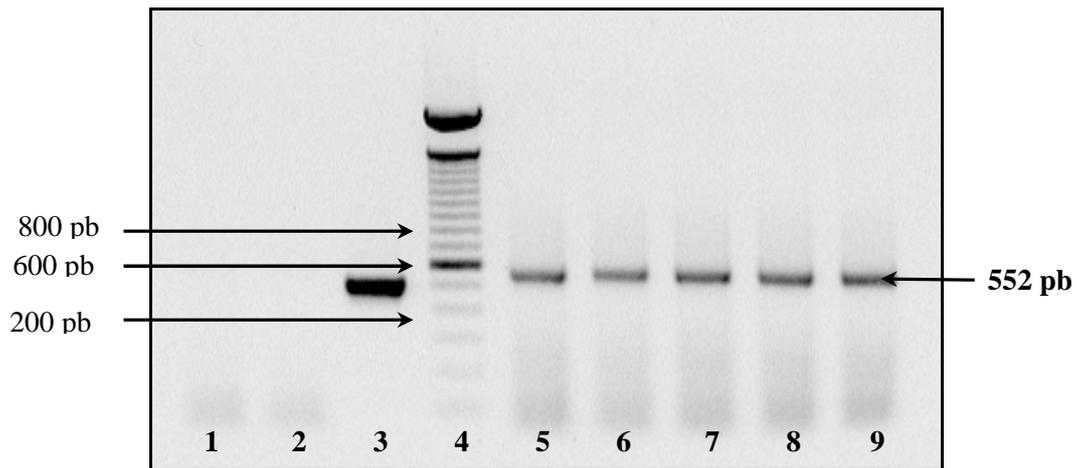


Figure R1 : Analyse des produits amplifiés par RT-PCR réalisée à partir des ARN totaux extraits de muscle squelettique humain.

L'ADNc de la TnI ainsi obtenu a une taille de 552 pb.

Piste 1 : contrôle négatif de PCR (amorces TnI sans ADN) ; **Piste 2 :** contrôle négatif de RT-PCR ; **Piste 3 :** contrôle positif de RT-PCR (ARNm de chloramphénicol acétyltransférase + amorces de la chloramphénicol acétyltransférase) ; **Piste 4 :** marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; **Pistes 5 à 9 :** TnI amplifiée à ARNm extraits du muscle squelettique humain (552 pb).

La spécificité de la PCR est vérifiée en digérant le produit amplifié par une endonucléase de restriction (*Pvu II*). Le résultat de cette digestion enzymatique visualisé après migration sur gel d'agarose à 1% (Figure R2), présente deux fragments sur le gel dont les tailles respectivement 205 pb et 347 pb correspondent aux tailles théoriques déterminées à l'aide du logiciel GeneWorks.

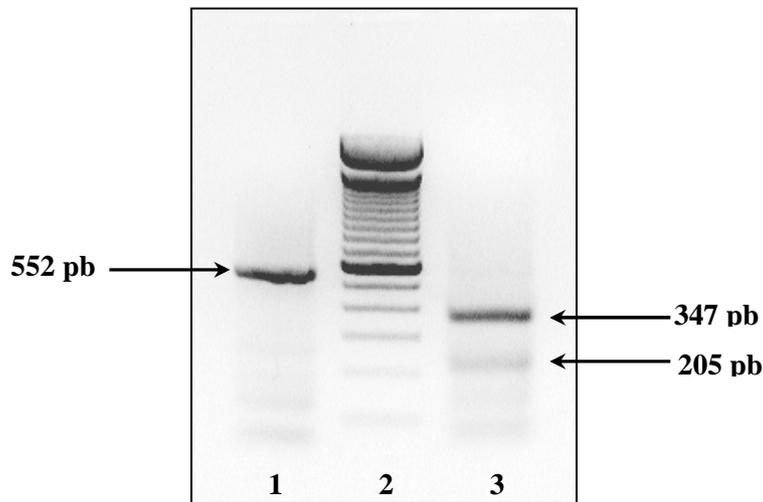


Figure R2 : Profil de digestion par l'enzyme de restriction *Pvu* II des produits de RT-PCR.

Les ADNc obtenus avec les amorces spécifiques de la séquence codante de la TnI sont digérés par l'enzyme *Pvu* II.

Piste 1 : produit de RT-PCR non digéré ; **Piste 2 :** marqueur de poids moléculaire de 100 pb; **Piste 3 :** produit de RT-PCR digéré (347 pb et 205 pb).

Le produit amplifié par PCR est alors purifié afin d'éliminer les traces de réactifs, d'oligonucléotides et de sels utilisés au cours de la réaction de RT-PCR dont la présence pourrait perturber le bon déroulement de la réaction de clonage.

I – 2. Clonage de la séquence codante de la TnI dans le plasmide pSecTag2C

A l'issue du clonage de la TnI dans le vecteur pSecTag2C, l'ADN plasmidique extrait des colonies bactériennes est analysé par digestion enzymatique. Les résultats montrent l'existence :

- de clones bactériens non recombinants (Figure R3, pistes 5 et 6)
- de clones recombinants avec le gène d'intérêt dans l'orientation « antisens » (Figure R3, piste 2)

- de clones recombinants avec le gène d'intérêt dans l'orientation « sens » (Figure R3, pistes 3, 4, 7 et 9)

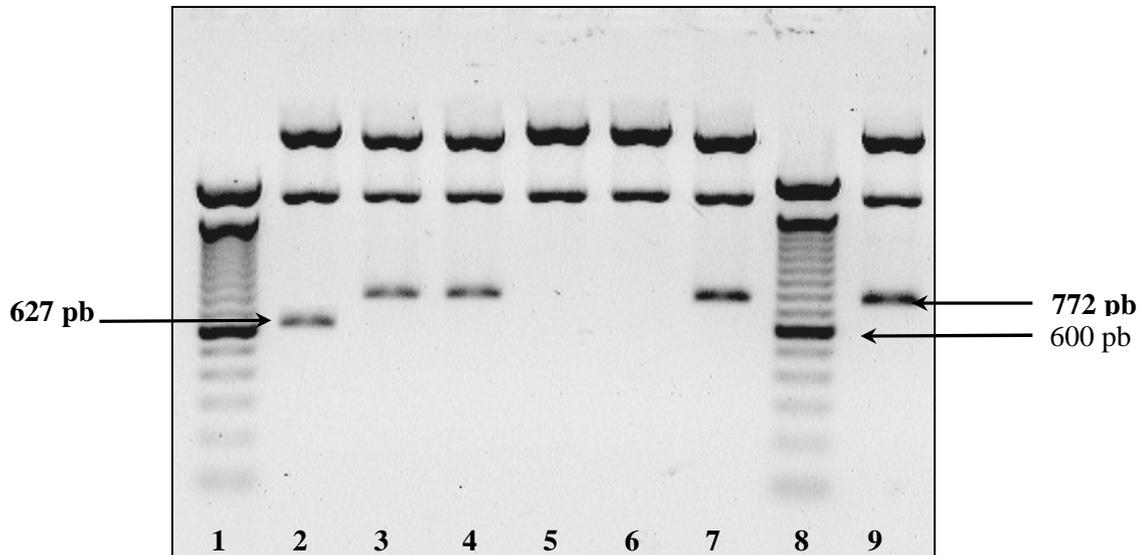


Figure R3 : Profil de digestion des clones bactériens obtenus après transformation avec le produit de ligation pSecTnITag.

L'ADN plasmidique est digéré par l'enzyme *Pvu* II.

Pistes 1 et 8: marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; **Piste 2 :** clone recombinant avec le gène d'intérêt inséré dans l'orientation « antisens » ; **Pistes 3, 4, 7 et 9 :** clones recombinants avec le gène d'intérêt inséré dans l'orientation « sens ».

L'insertion du gène d'intérêt dans l'orientation « sens » est caractérisée par un fragment de 772 pb visualisé après migration des produits en gel d'agarose 1%. Lorsque le gène est inséré dans le plasmide dans l'orientation « antisens », le produit de digestion mis en évidence après migration a une taille de 627 pb.

Un clone dans lequel le produit de PCR est inséré selon l'orientation « sens » est sélectionné. Les maxipréparations et gigapréparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de ce clone bactérien. Ce plasmide recombinant, nommé pSecTnITag, en référence à la protéine de fusion codée, sera utilisé pour les expériences de transfection en culture cellulaire

et pourra être complexé aux liposomes cationiques pour les expérimentations *in vitro* et *in vivo*.

I – 3. Vérification de la construction plasmidique pSecTnITag

L'identité du produit « sens » est vérifiée par séquençage dans les deux directions après amplification et purification de l'ADN plasmidique. Le résultat du séquençage est présenté sur la Figure R4. Il montre que le cadre de lecture de la construction est conservé, la protéine exprimée à partir de ce plasmide recombinant, nommée SecTnITag, correspond à la fusion entre la séquence de sécrétion codée par le plasmide, l'ADNc de la TnI et l'épitope Myc. Cette analyse met également en évidence l'existence d'une erreur de nucléotide en position 266 par rapport à la séquence décrite par Zhu (Zhu *et al.*, 1994). Cette modification d'une base observée se traduit par le changement d'un acide aminé en position 99 ; dans notre construction l'isoleucine est remplacée par une thréonine.

	Sequencing alignment	
Complément séquençage antisens	-----ACGGG GCCCAGCCGG CCAGGGCGCG GCGCCGTACG	35
Séquençage sens	CAGGTCCAC TGGTACCGG GCCCAGCCGG CCAGGGCGCG GCGCCGTACG	97
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CAGGTCCAC TGGTACCGG GCCCAGCCGG CCAGGGCGCG GCGCCGTACG	1000
Consensus	CAGGTCCAC TGGTACCGG GCCCAGCCGG CCAGGGCGCG GCGCCGTACG	1000
Complément séquençage antisens	TACGAGCTA TCGGAGATGA GGAGAAGCGG AACAGGGCCA TCACGGCCCG	85
Séquençage sens	TACGAGCTA TCGGAGATGA GGAGAAGCGG AACAGGGCCA TCACGGCCCG	147
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	TACGAGCTA TCGGAGATGA GGAGAAGCGG AACAGGGCCA TCACGGCCCG	1050
Consensus	TACGAGCTA TCGGAGATGA GGAGAAGCGG AACAGGGCCA TCACGGCCCG	1050
Complément séquençage antisens	CAGGCAGCAC CTGAAGAGCG TGATGCTGCA GATAGCGGCC ACGGAGCTGG	135
Séquençage sens	CAGGCAGCAC CTGAAGAGCG TGATGCTGCA GATAGCGGCC ACGGAGCTGG	197
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CAGGCAGCAC CTGAAGAGCG TGATGCTGCA GATAGCGGCC ACGGAGCTGG	1100
Consensus	CAGGCAGCAC CTGAAGAGCG TGATGCTGCA GATAGCGGCC ACGGAGCTGG	1100
Complément séquençage antisens	AGAAGGAGGA GAGCCGCCGT GAGGCAGAGA AGCAGAACTA CCTGCGGAG	185
Séquençage sens	AGAAGGAGGA GAGCCGCCGT GAGGCAGAGA AGCAGAACTA CCTGCGGAG	247
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	AGAAGGAGGA GAGCCGCCGT GAGGCAGAGA AGCAGAACTA CCTGCGGAG	1150
Consensus	AGAAGGAGGA GAGCCGCCGT GAGGCAGAGA AGCAGAACTA CCTGCGGAG	1150
Complément séquençage antisens	CACTGCCCGC CGCTGCATTC CCCGGGCTCC ATGTCTGAAG TGCAGGAGCT	235
Séquençage sens	CACTGCCCGC CGCTGCATTC CCCGGGCTCC ATGTCTGAAG TGCAGGAGCT	297
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CACTGCCCGC CGCTGCATTC CCCGGGCTCC ATGTCTGAAG TGCAGGAGCT	1200
Consensus	CACTGCCCGC CGCTGCATTC CCCGGGCTCC ATGTCTGAAG TGCAGGAGCT	1200
Complément séquençage antisens	CTGCAAAACAG CTGCACGCCA AGATCGATGC GGCTGAAGAG GAGAAGTACG	285
Séquençage sens	CTGCAAAACAG CTGCACGCCA AGATCGATGC GGCTGAAGAG GAGAAGTACG	347
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CTGCAAAACAG CTGCACGCCA AGATCGATGC GGCTGAAGAG GAGAAGTACG	1250
Consensus	CTGCAAAACAG CTGCACGCCA AGATCGATGC GGCTGAAGAG GAGAAGTACG	1250
Complément séquençage antisens	ACATGGAGGT GAGGGTGCG AAGACCAGCA AGGAGCTGGA GGACATGAAC	335
Séquençage sens	ACATGGAGGT GAGGGTGCG AAGACCAGCA AGGAGCTGGA GGACATGAAC	397
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	ACATGGAGGT GAGGGTGCG AAGACCAGCA AGGAGCTGGA GGACATGAAC	1300
Consensus	ACATGGAGGT GAGGGTGCG AAGACCAGCA AGGAGCTGGA GGACATGAAC	1300
Complément séquençage antisens	CAGAAGCTAT TTGATCTGCG GGGCAAGTTC AAGCGGCCCC CACTGCGGAG	385
Séquençage sens	CAGAAGCTAT TTGATCTGCG GGGCAAGTTC AAGCGGCCCC CACTGCGGAG	447
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CAGAAGCTAT TTGATCTGCG GGGCAAGTTC AAGCGGCCCC CACTGCGGAG	1350
Consensus	CAGAAGCTAT TTGATCTGCG GGGCAAGTTC AAGCGGCCCC CACTGCGGAG	1350
Complément séquençage antisens	GGTGGCATG TCGGCCGATG CCATGCTCAA GGCCTGCTG GGCTCGAAGC	435
Séquençage sens	GGTGGCATG TCGGCCGATG CCATGCTCAA GGCCTGCTG GGCTCGAAGC	497
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	GGTGGCATG TCGGCCGATG CCATGCTCAA GGCCTGCTG GGCTCGAAGC	1400
Consensus	GGTGGCATG TCGGCCGATG CCATGCTCAA GGCCTGCTG GGCTCGAAGC	1400
Complément séquençage antisens	CAAGGTGTG CATGGACCTG AGGGCCAACC TGAAGCAGGT CAAGAAGGAG	485
Séquençage sens	CAAGGTGTG CATGGACCTG AGGGCCAACC TGAAGCAGGT CAAGAAGGAG	547
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CAAGGTGTG CATGGACCTG AGGGCCAACC TGAAGCAGGT CAAGAAGGAG	1450
Consensus	CAAGGTGTG CATGGACCTG AGGGCCAACC TGAAGCAGGT CAAGAAGGAG	1450
Complément séquençage antisens	GACACAGAGA AGGAGCGGGA CCTGCGAGAC GTGGGTGACT GGAGGAAGAA	535
Séquençage sens	GACACAGAGA AGGAGCGGGA CCTGCGAGAC GTGGGTGACT GGAGGAAGAA	597
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	GACACAGAGA AGGAGCGGGA CCTGCGAGAC GTGGGTGACT GGAGGAAGAA	1500
Consensus	GACACAGAGA AGGAGCGGGA CCTGCGAGAC GTGGGTGACT GGAGGAAGAA	1500
Complément séquençage antisens	TATCGAGGAG AAGTCTGGCA TGGAGGGCCG GAAGAAGATG TTTGAGTCCG	585
Séquençage sens	TATCGAGGAG AAGTCTGGCA TGGAGGGCCG GAAGAAGATG TTTGAGTCCG	647
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	TATCGAGGAG AAGTCTGGCA TGGAGGGCCG GAAGAAGATG TTTGAGTCCG	1550
Consensus	TATCGAGGAG AAGTCTGGCA TGGAGGGCCG GAAGAAGATG TTTGAGTCCG	1550
Complément séquençage antisens	AGTCCGGTAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTCCAGTG TGGTGGAAAT	635
Séquençage sens	AGTCCGGTAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTCCAGTG TGGTGGAAAT	697
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	AGTCCGGTAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTCCAGTG TGGTGGAAAT	1600
Consensus	AGTCCGGTAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC CACTCCAGTG TGGTGGAAAT	1600
Complément séquençage antisens	CTGCAGATAT CCAGCACAGT GCGGCCCGCT CGAGGAGGCG CCGAACAAAA	685
Séquençage sens	CTGCAGATAT CCAGCACAGT GCGGCCCGCT CGAGGAGGCG CCGAAC----	743
Séquence de la TnI dans le plasmide pSecTag	CTGCAGATAT CCAGCACAGT GCGGCCCGCT CGAGGAGGCG CCGAACAAAA	1650
Consensus	CTGCAGATAT CCAGCACAGT GCGGCCCGCT CGAGGAGGCG CCGAACAAAA	1650

Figure R4 : Séquençage du plasmide pSecTnITag.

Le changement de base est encadré en rouge. La séquence codante de la TnI est entre les crochets verts.

II. Vérification de la fonctionnalité des plasmides recombinants

II – 2. Evaluation des constructions plasmidiques

La validité des plasmides doit être contrôlée avant leur utilisation en thérapie génique. Ils doivent permettre l'expression et la sécrétion de protéines de fusion SecTnITag et SecEndo après transfection des lignées cellulaires utilisées. L'action antiangiogénique des protéines recombinantes est ensuite évaluée et comparée *in vitro* sur les lignées cellulaires présentées.

II – 2 – 1. Expression des protéines recombinantes par les cellules 1547

Dans le cas des cellules 1547, la transfection est réalisée par électroporation de ces cellules par les différents plasmides linéarisés : pSecTag2, pSecEndo, pSecTnITag. Les clones cellulaires résultant de l'électroporation sont respectivement nommés : 1547/pSecTag2, 1547/pSecEndo et 1547/pSecTnITag.

II – 2 – 1 – 1. Vérification de l'intégration des plasmides

L'ADNg est extrait des clones cellulaires sélectionnés après électroporation par les constructions plasmidiques. Une vérification de l'intégration de la séquence plasmidique dans le génome cellulaire est réalisée par PCR utilisant l'ADNg comme matrice et avec les amorces spécifiques des constructions pSecTnITag et pSecEndo.

II – 2 – 1 – 1 – 1. Intégration du plasmide pSecTnITag

Les produits amplifiés sont visualisés après migration en gel d'agarose, dont le résultat est présenté sur la Figure R5.

Un signal positif correspondant à un fragment de taille 784 pb est observé au niveau des pistes correspondant aux clones ayant intégré la construction pSecTnITag dans leur génome (Figure R5, pistes 8 et 9). La taille de ce fragment est identique à celle du contrôle positif de PCR (Figure R5, piste 4), constitué par le plasmide pSecTnITag linéarisé par *Pvu* I et amplifié par PCR. Aucun fragment amplifié n'est présent dans les pistes correspondantes aux cellules parentales, aux cellules 1547/pSecTag2 et dans le «blanc» (amorces seules), ce qui nous indique que le fragment amplifié visualisé n'est pas du à une contamination par de l'ADN exogène. L'absence de produit amplifié dans la piste correspondant au contrôle négatif de PCR (piste 3) confirme la spécificité de la réaction. Le contrôle négatif est constitué par le plasmide pSecTag2C amplifié à l'aide du jeu d'amorces du plasmide pSecTnITag.

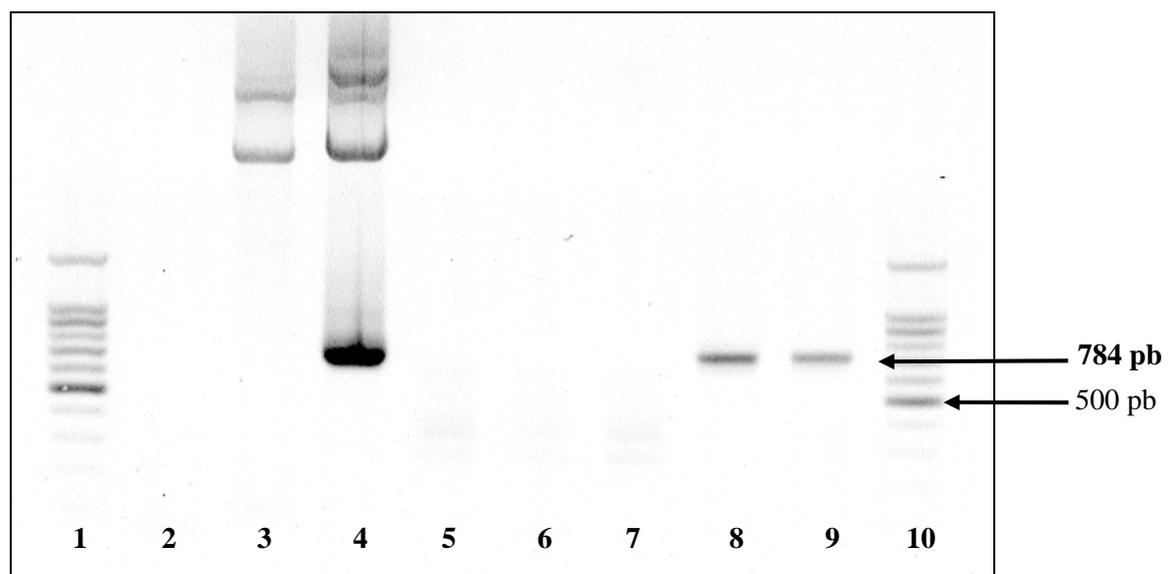


Figure R5 : Analyse par PCR de l'intégration du plasmide pSecTnITag dans les cellules 1547 électroporées.

La PCR est réalisée sur les ADNg extraits des cellules 1547 parentales et des différents clones cellulaires électroporés.

Piste 1 : marqueur de poids moléculaire de 100 pb ; **Piste 2** : « blanc » (amorces seules) ; **Piste 3** : contrôle négatif : plasmide pSecTag2 + amorces de la TnI ; **Piste 4** : Contrôle positif : plasmide pSecTnITag + amorces de la TnI ; **Piste 5** : cellules 1547 parentales ; **Piste 6 et 7** : cellules 1547/pSecTag2 ; **Pistes 8 et 9** : cellules 1547 ayant intégré la construction (notées 1547/pSecTnITag) ; **Piste 10** : marqueur de poids moléculaire de 100 pb.

II – 2 – 1 – 1 – 2. Plasmide pSecEndo

De manière identique, l'intégration du plasmide pSecEndo dans le génome des cellules 1547/pSecEndo est mise en évidence par PCR utilisant l'ADNg comme matrice et avec les amorces spécifiques des constructions pSecEndo. Un produit amplifié d'une taille de 631pb est visualisé, après électrophorèse sur gel d'agarose, uniquement dans les pistes correspondantes aux clones cellulaires ayant intégré la construction dans leur génome (Figure R6, pistes 6 et 7).

Le contrôle négatif de la PCR est formé par le plasmide pSecTag2C amplifié par les amorces spécifiques de l'endostatine. L'absence de signal dans la piste 2 (correspondant à ce contrôle) indique la spécificité de la réaction.

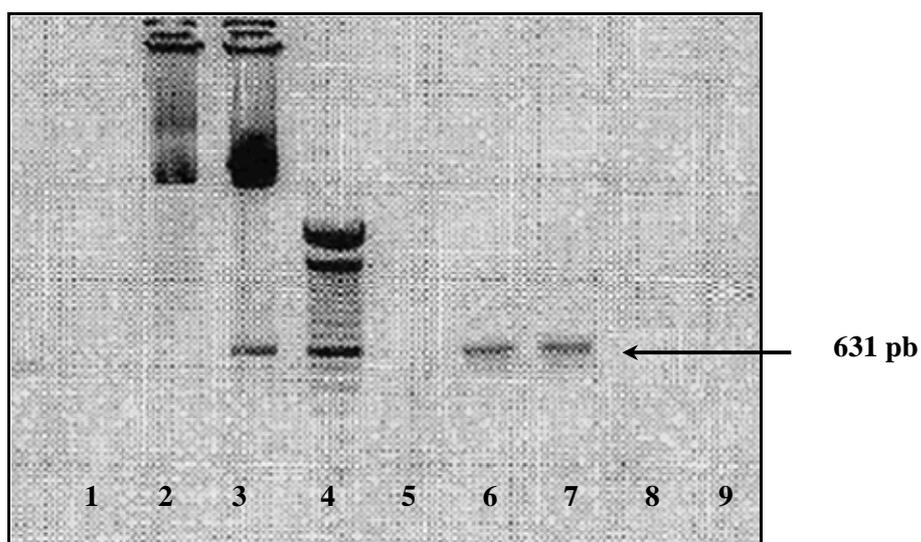


Figure R6 : Analyse par PCR de l'intégration du plasmide pSecEndo dans les cellules 1547 électroporées.

Piste 1 : « blanc » (amorces seules) ; **Piste 2 :** contrôle négatif : plasmide pSecTag2 + amorces de l'endostatine ; **Piste 3 :** Contrôle positif : plasmide pSecEndo + amorces de l'endostatine ; **Piste 4** échelle de poids moléculaire **Piste 5 :** cellules 1547 non transfectées ; **Pistes 6 et 7 :** cellules 1547 ayant intégré la construction (notées 1547/pSecEndo) ; **Pistes 8 et 9 :** cellules 1547/pSecTag2.

Cette détection spécifique des fragments amplifiés associée au fait que la croissance des cellules électroporées n'est pas inhibée par la présence de zéocine (100 µg/ml) confirme l'intégration de la construction dans le génome de la cellule de manière stable.

II – 2 – 1 – 2. Détection de l'expression des protéines recombinantes

L'expression des protéines d'intérêt est recherchée sur les clones cellulaires ayant intégré la construction d'intérêt (pSecTnITag ou pSecEndo) dans leur génome.

Deux méthodes d'immunodétection sont appliquées pour mettre en évidence l'expression des protéines, endostatine et TnI recombinantes.

II – 2 – 1 – 2 – 1. Détection par Western Blot

Le Western Blot est utilisé pour détecter l'expression de la protéine d'intérêt (endostatine ou TnI) dans les clones cellulaires 1547/pSecEndo et 1547/pSecTnITag. Pour permettre une détection des protéines par Western Blot, une quantité importante de cellules est nécessaire (5.10^6 cellules).

II – 2 – 1 – 2 – 1 – a. Détection de la protéine TnITag

Le Western blot est réalisé sur les protéines des cellules 1547/pSecTnITag. Un anticorps primaire dirigé contre l'isoforme musculaire de la TnI n'étant pas disponible dans le commerce, la détection de l'expression de cette protéine est réalisée grâce à sa fusion avec l'épitope Myc du plasmide pSecTag2.

Le résultat de cette détection est présenté sur la Figure R7. Elle montre la présence d'un signal de taille 60 kDa et correspondant à l'albumine bovine, dans toutes les pistes ; une seconde bande de poids moléculaire voisin de 40 kDa est également visualisée.

Par contre un signal correspondant à un poids moléculaire de 24 kDa est détecté uniquement dans la piste 4 correspondant aux cellules 1547/pSecTnITag. Cette taille correspond à celle attendue pour la protéine de fusion SecTnIMyc. De plus l'absence de cette bande dans les pistes correspondantes aux protéines extraites des cellules parentales et du clone 1547/pSecTag2 met en évidence la spécificité de la détection et confirme que la protéine détectée est la protéine de fusion TnITag.

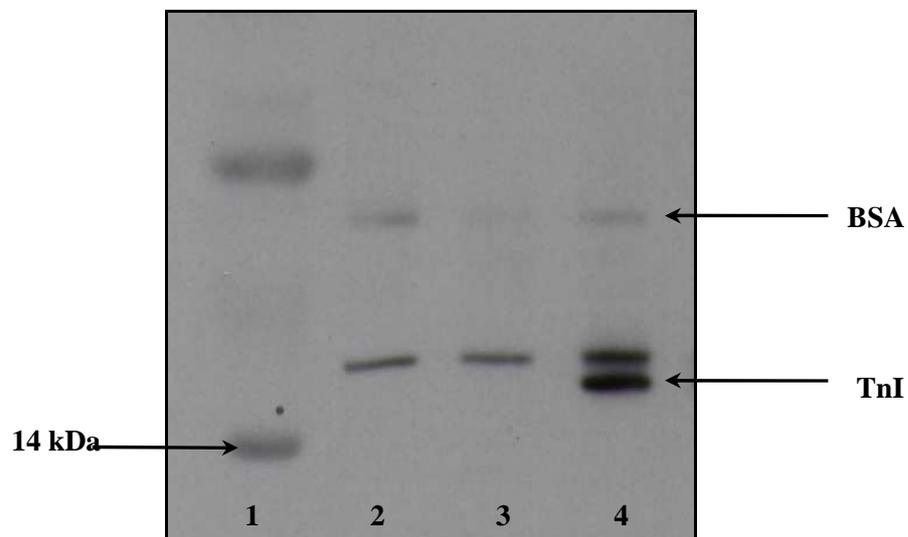


Figure R7 : Détection de l'expression de la TnI par Western blot.

20 mg de protéines cellulaires totales sont séparées par électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose et sont soumises à une détection par l'anticorps anti-Myc. **Piste 1** : standards protéiques **Piste 2** cellules 1547 non transfectées, **Piste 3** cellules 1547/pSecTag2 ; **Piste 4** cellules 1547/pSecTnITag

II – 2 – 1 – 2 – 1 – b. Détection de la protéine SecEndo

Le résultat du Western Blot réalisé sur les protéines cellulaires des cellules 1547 parentales, des clones 1547/pSecEndo est présenté sur la Figure R8.

Une bande correspondant à l'albumine bovine (masse moléculaire de 60 kDa) est détectée dans toutes les pistes. Dans la piste 3 une bande correspondant à une masse moléculaire de 20 - 21 kDa est observée, taille théoriquement attendue pour l'endostatine. Les protéines déposées dans cette piste ont été extraites du clone cellulaire 1547/pSecEndo exprimant l'endostatine. De plus l'absence de ce signal dans les autres pistes montre la spécificité de la détection et indique que la protéine ainsi visualisée correspond à l'endostatine.

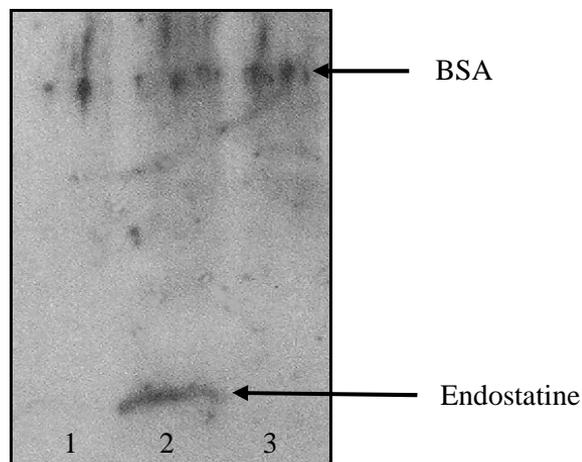


Figure R8: Détection de l'expression de l'endostatine par Western blot.

20 mg de protéines cellulaires totales sont séparées par électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose et soumises à une détection par l'anticorps anti-endostatine. **Piste 1** standards protéiques **Piste 2** : cellules 1547 non transfectées, **Piste 3** : cellules 1547/pSEcEndo, **Piste 4** : cellules 1547/pSecTag2.

II – 2 – 1 – 2 – 2. Détection en immunohistochimie

Cette technique permet la détection des protéines *in situ*, sur les cellules en culture. Elle est effectuée sur les clones cellulaires 1547/pSecTnITag et 1547/pSecEndo

Le marquage indirect des protéines est réalisé à l'aide des mêmes anticorps primaires utilisés pour les Western Blot révélé ici par un anticorps secondaire couplé à la FITC. Les cellules possèdent une auto-fluorescence verte qui gêne l'interprétation des résultats. Elles sont donc contre-colorées au Bleu Evans qui induit une coloration cellulaire rouge.

Des contrôles constitués du clone cellulaire 1547/pSecTnITag ou 1547/pSecEndo pour lequel soit le conjugué couplé à la fluorescence soit l'anticorps anti-Myc est omis lors de réaction de détection, nous assurent de la spécificité de la détection. En effet dans ces deux cas comme pour les cellules 1547 parentales aucun marquage fluorescent n'est détecté (Figure R9A et R9C).

Un marquage granulaire majoritairement cytoplasmique est décelé uniquement dans les cellules transfectées par les plasmides recombinants pSecTnITag et pSecEndo et exprimant la protéine de fusion TnITag (détection par l'anticorps primaire dirigé contre l'épitope Myc) ou endostatine (détection par l'anticorps primaire dirigé contre l'endostatine). L'intensité du signal obtenue est variable selon les cellules ce qui indique la variabilité d'expression de la protéine de fusion aussi bien TnITag qu'endostatine. D'autre part, pour les deux protéines une fluorescence verte diffuse est visualisée à la périphérie des cellules démontrant la sécrétion des protéines due à la séquence Igκ (Figure R9B et R9D).

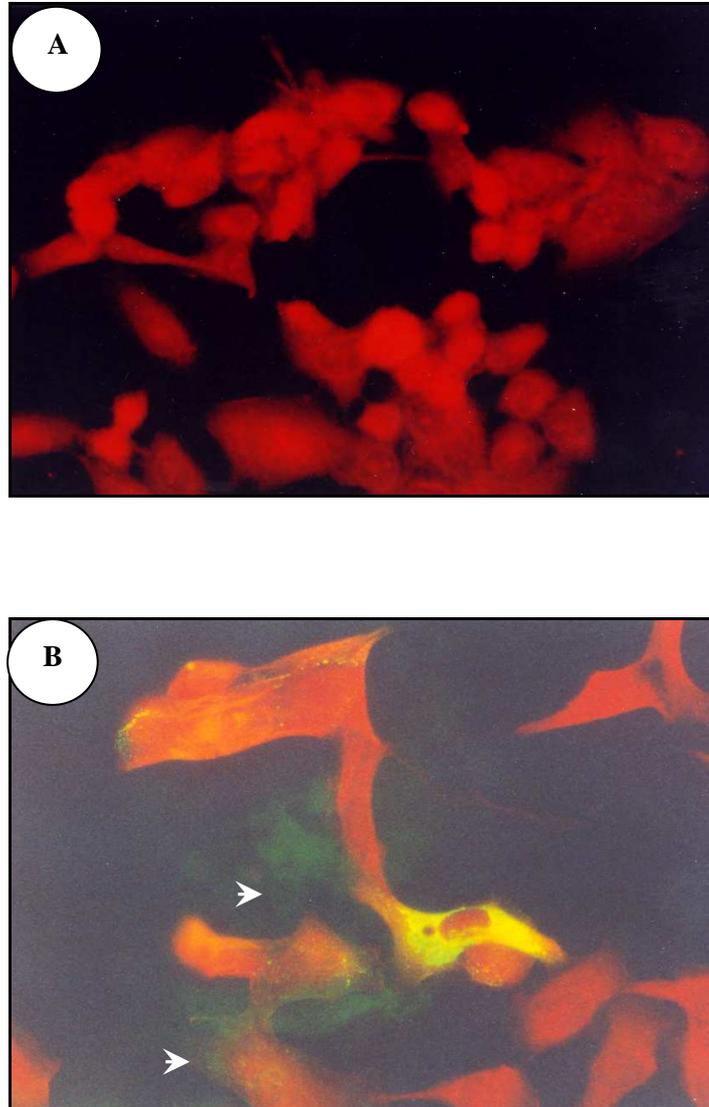


Figure R9 : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules 1547.

A : Cellules 1547 parentales, avec l'anticorps anti-Myc et le conjugué couplé à la fluorescéine

B : Cellules 1547/pSecTnI, incubées avec l'anticorps anti-Myc et le conjugué couplé à la fluorescéine.

Un marquage cytoplasmique vert correspondant à la protéine de fusion est détecté dans les cellules exprimant la construction pSecTnITag. Un marquage diffus peut être observé hors des cellules, il correspond à la protéine sécrétée (flèches blanches). (Grossissement x 200).

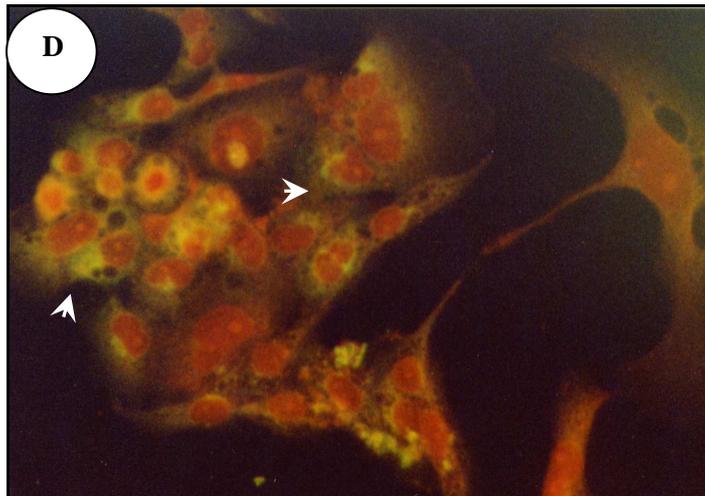
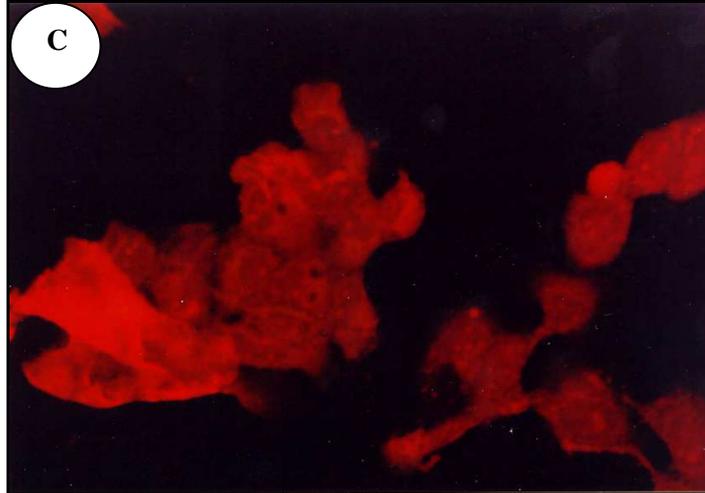


Figure R9 (suite) : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules 1547.

C : Cellules 1547 parentales

D : Cellules 1547/pSecEndo, incubées sans l'anticorps anti-Endostatine et le conjugué à la fluorescéine. (Grossissement x 200).

II – 2 – 2. Expression des protéines recombinantes par les cellules EJM

Les cellules EJM transfectées transitoirement à l'aide des constructions plasmidiques recombinantes expriment elles aussi les protéines d'intérêt. L'expression de ces dernières peut être mise en évidence en utilisant la même méthode de détection par immunohistochimie. Les contrôles sont constitués des cellules transfectées pour lesquelles soit le conjugué couplé à la fluorescence soit l'anticorps anti-Myc est omis lors de réaction de détection. Ils nous assurent de la spécificité de la détection ; dans ces deux cas comme pour les cellules EJM non transfectées, aucun marquage fluorescent n'est détecté (Figure R10A).

Nous obtenons des résultats similaires à ceux décrits pour les cellules 1547 électroporées. Un marquage granulaire intracytoplasmique vert est observé pour les cellules exprimant la protéine d'intérêt. Un faible nombre de cellules présente une coloration cytoplasmique verte, mettant en évidence le faible taux de transfection des cellules EJM (Figure R10B). Les résultats présentés sur la Figure R10 sont ceux obtenus après transfection des cellules EJM par la construction pSecTnITag ; un marquage similaire est observé lors de la transfection des cellules par la construction pSecEndo.

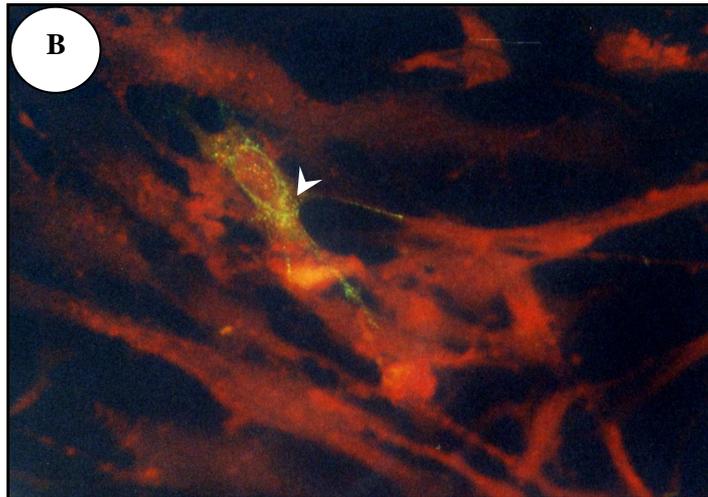
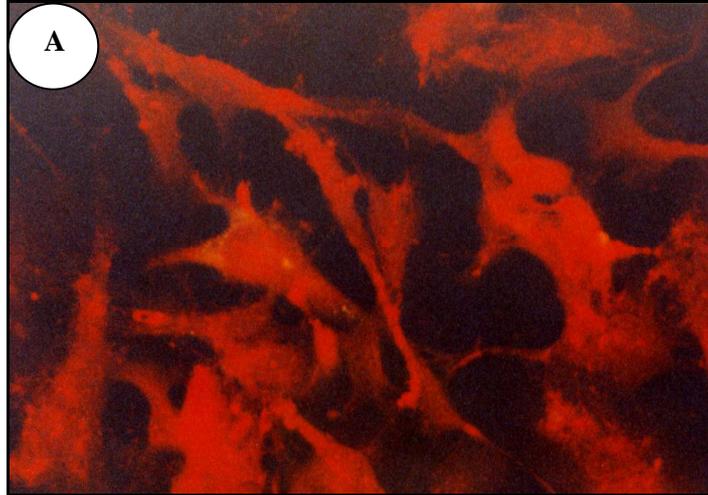


Figure R10 : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules EJC.

48 h après la transfection des cellules EJC par les plasmides pSecTnITag un marquage cytoplasmique vert correspondant à la protéine de fusion est observé dans quelques cellules EJC

A : Cellules EJC non transfectées

B : Cellules EJC/pSecTnITag incubées avec l'anticorps anti-Myc et le conjugué couplé à la fluorescéine. (Grossissement x 200).

II – 3. Evaluation de l'activité antiangiogénique de la protéine sécrétée

Nous avons pu mettre en évidence que les constructions plasmidiques, que nous allons utiliser dans les protocoles de thérapie génique antiangiogénique chez l'animal, permettent bien l'expression et la sécrétion des agents antiangiogéniques endostatine et TnI après transfection des cellules *in vitro*. Désormais il faut nous assurer que la protéine pour laquelle ils codent est sécrétée sous sa forme active, et possède une action antiangiogénique. Ce dernier point est vérifié par des expériences de cocultures verticales.

Les différentes populations cellulaires utilisées ne prolifèrent pas à la même vitesse, et ne nécessitent pas les mêmes conditions de culture. Les sous lignées 1547/pSecTag2, pSecEndo et pSecTnITag sont cultivées en présence d'un antibiotique de sélection : la zéocine. Des études de croissance comparatives sont réalisées entre les cellules 1547 parentales, les sous lignées électroporées 1547/pSecTag2, 1547/pSecEndo et 1547/pSecTnITag et les cellules EJG. Le milieu de culture est celui des cellules EJG. L'analyse des vitesses de prolifération comparatives permet d'établir les conditions de coculture verticale.

L'étude de ces courbes de croissance comparatives indique que la croissance des cellules 1547 parentales et celle des sous lignées électroporées ne sont pas similaires (Figure R11). Les cellules parentales présentent une phase stationnaire de 36 h puis une phase exponentielle de croissance. Leur temps de doublement est alors de 18 h. Outre une phase de latence plus longue, de 48 h, les cellules 1547 électroporées prolifèrent plus lentement ; leur temps de doublement est de 24 h, ces cellules n'atteignent pas le même état de confluence que les cellules 1547 parentales. Par contre ces cellules électroporées se décolent de leur support de culture plus tardivement que les cellules parentales; les cellules entrent dans la phase de

déclin de croissance 3 jours plus tard que les cellules parentales. Les cellules EJG peuvent rester 14 jours en culture sans atteindre la confluence ni se détacher de leur support.

Les différences de profils de croissance entre cellules 1547 parentales et électroporées sont dues à la pression exercée par l'antibiotique de sélection présent en permanence dans le milieu de culture.

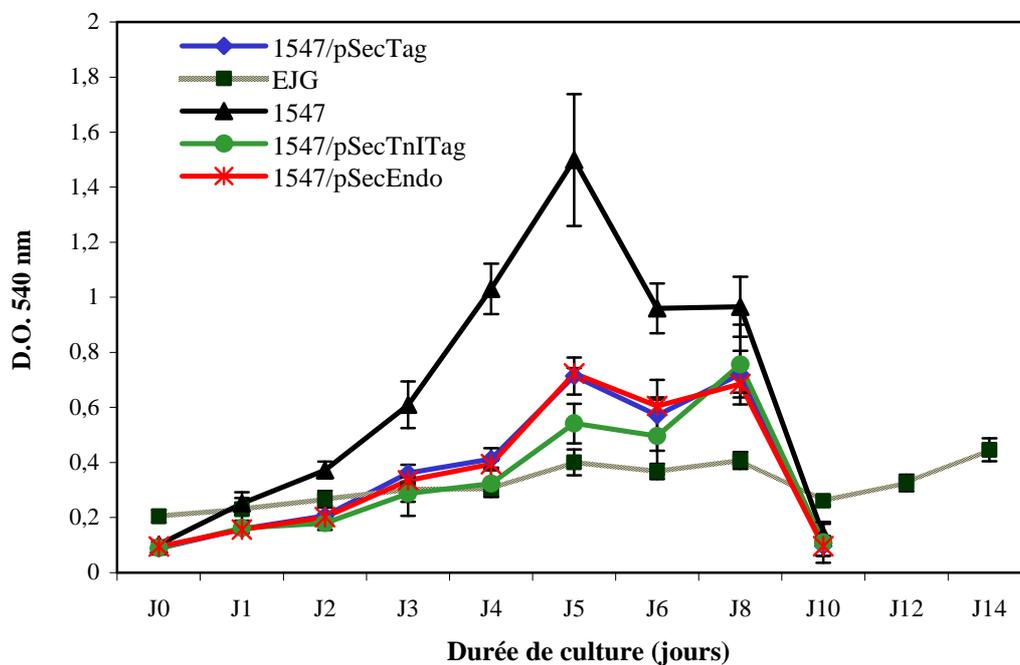


Figure R11: Courbes de la croissance comparative des cellules EJG, 1547 parentales, 1547/pSecTag2, 1547/pSecTnITag, 1547/pSecEndo.

Les différentes lignées cellulaires sont maintenues dans le même milieu de culture. Les numérations sont effectuées quotidiennement, par le test de réduction du MTT et la mesure de la densité optique ($\lambda = 540 \text{ nm}$). Après 5 jours de culture dans ces conditions, les cellules 1547 parentales ont atteint l'état de confluence. Ces cellules dont la prolifération est la plus rapide, servent de référence pour la mise en culture dans les cupules de coculture.

Ces comparaisons de croissance cellulaire, nous permettent de fixer les conditions d'expérimentation de la coculture verticale. Les différentes sous lignées de cellules 1547 sont placées au contact des cellules EJJ lorsque ces dernières sortent de la phase de latence (soit 48 h après leur ensemencement) et les inserts de coculture seront remplacés tous les 4 jours. Au cours de ces cocultures verticales, trois contrôles sont inclus :

- cellules EJJ
- cellules EJJ mises au contact des cellules 1547 parentales
- cellules EJJ mises au contact des cellules 1547/pSecTag2.

Ces contrôles ont pour fonction de nous assurer que les cellules 1547 parentales ou transfectées par le plasmide vide n'ont pas d'effet sur la croissance des cellules EJJ.

II – 3 – 1. Coculture verticale de cellules EJJ et 1547/pSecEndo

L'effet de l'endostatine, produite et sécrétée dans le milieu de culture par les cellules 1547/pSecEndo, sur la prolifération des cellules EJJ est apprécié sur une durée totale de 13 jours (Figure R12).

La croissance des cellules EJJ n'est pas affectée par la présence des cellules 1547 parentales ou 1547/pSecTag2. Les cellules EJJ voient leur croissance ralentie uniquement lorsqu'elles sont en coculture avec les cellules 1547/pSecEndo. Une durée de coculture de 10 jours est suffisante pour entraîner un retard de croissance significatif ($p < 0,05$ à j12). En effet, l'inhibition de la prolifération des cellules EJJ en coculture avec les cellules 1547/pSecEndo est de 42% à J12 par rapport aux cellules « témoin ». Ce résultat met en évidence que la protéine sécrétée possède une action antiangiogénique *in vitro*.

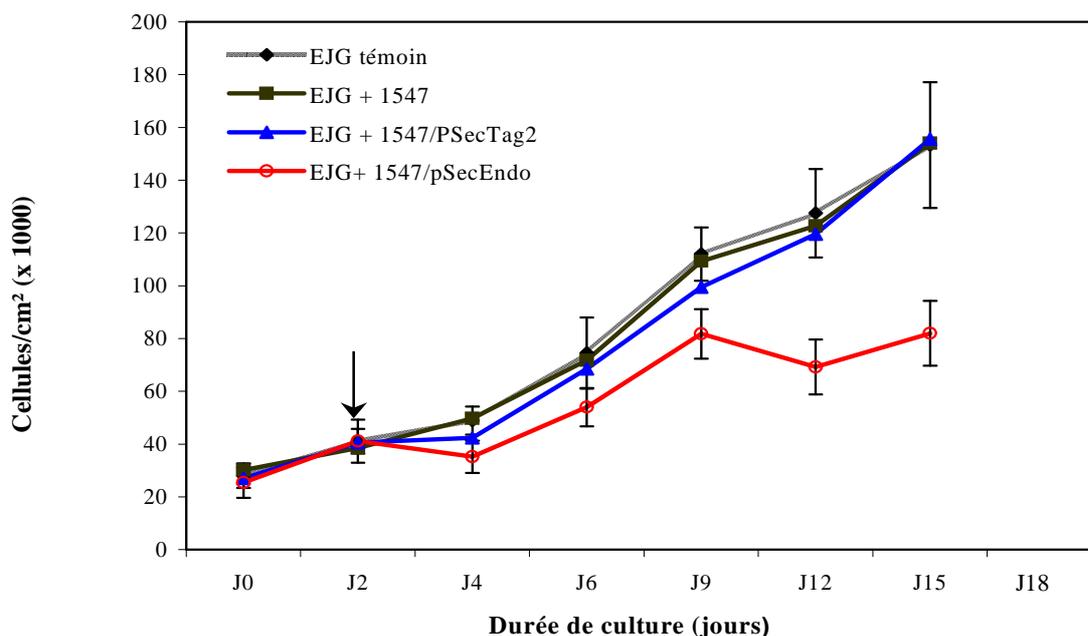


Figure R12 : Courbes de croissance comparative des cellules EJG en co-culture avec les cellules 1547/pSecEndo.

Les inserts de culture dans lesquels les différentes lignées de cellules 1547 (parentales, 1547/pSecTag2, 1547/pSecEndo) sontensemencés sont mis au contact des cellules EJG 48 h après la mise en culture de ces dernières(→ à J2 indique le début de la coculture). Les numérations sont effectuées tous les 2 -3 jours par le test d'exclusion du bleu trypan.

II – 3 – 2. Coculture verticale des cellules EJG et de la sous lignée 1547/pSecTnITag

La même expérience de coculture verticale est réalisée en maintenant les cellules EJG en présence de la sous-lignée 1547/pSecTnITag. Comme lors de l'essai précédent, l'effet de la sécrétion continue de la TnI synthétisée par les cellules 1547/pSecTnITag sur la prolifération des cellules EJG est apprécié sur une durée totale de 13 jours (Figure R13)

Aucune inhibition significative de la prolifération des cellules EJG n'est observée lorsqu'elles sont maintenues en présence des cellules 1547 parentales ou 1547/pSecTag2. La

croissance des cellules EJM est affectée lorsque celles-ci sont maintenues en culture en présence des cellules 1547/pSecTnITag. L'activité inhibitrice de la protéine sécrétée par les cellules 1547/pSecTnITag se traduit par une inhibition de croissance significative de 43% par rapport aux cellules « témoin » à J9 ($p < 0,05$). La régression de la croissance des cellules EJM se poursuit, et atteint 85% à J 12 ($p < 0,05$).

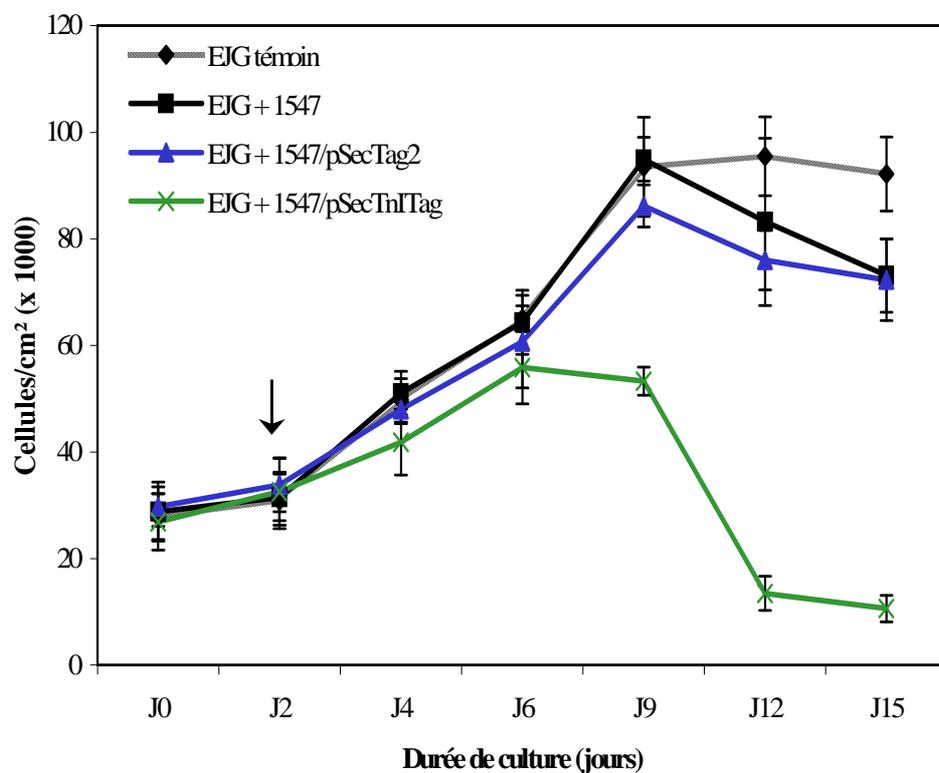


Figure R13 : Courbes de croissance comparative des cellules EJM en coculture avec les cellules 1547/pSecTnITag.

Les inserts de culture dans lesquels les différentes lignées de cellules 1547 (parentales, 1547/pSecTag2, 1547 pSecTnITag) sontensemencés, placés au contact des cellules EJM 48 h après la mise en culture de ces dernières (→ à J2 indique le début de la coculture). Les numérations sont effectuées tous les 2– 3 jours par le test d'exclusion du bleu trypan

De cet essai de coculture verticale nous pouvons déduire que:

- les protéines antiangiogéniques codées par les plasmides recombinants sont, après transfection, synthétisées et sécrétées sous leur forme active.
- les cellules endothéliales en contact permanent avec l'agent antiangiogénique ne semblent pas développer de système visant à inhiber l'action antiproliférative des protéines testées.
- la TnI est *in vitro* et dans le contexte de coculture, un agent antiangiogénique a priori plus efficace que l'endostatine.

III. Effets de la transfection des ADNc de l'endostatine et de la TnI sur les modèles cellulaires

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ces gènes antiangiogéniques, endostatine et TnI, appliqués au traitement de l'ostéosarcome greffable de rat. *In vivo*, ces gènes sont administrés sous forme complexée à des liposomes cationiques désignés par le terme de lipoplexes.

Les lipoplexes vont être dans un premier temps utilisés *in vitro* sur les modèles cellulaires mimant le modèle animal. Les cellules 1547 et EJG sont transfectées par ces lipoplexes. L'effet des deux gènes sur la croissance, la morphologie et éventuellement la mort cellulaire sont appréciées et leur potentiel antiangiogénique *in vitro* comparé.

Les liposomes cationiques et les lipoplexes/pSecTag2 servent de contrôle pour chaque expérience réalisée. Ces contrôles permettent de déterminer dans quelle mesure un plasmide vide (sans gène d'intérêt) ou des liposomes peuvent modifier le comportement cellulaire (en terme de croissance et de morphologie cellulaires). Les effets des lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag sur les cellules sont évalués par rapport à ces contrôles.

III – 1. Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées

L'analyse de la prolifération et de la morphologie cellulaires est nécessaire car elle nous permet de déterminer le comportement de chaque lignée cellulaire en culture. La connaissance de ces paramètres est indispensable pour pouvoir entreprendre les expériences à venir, et nous permettre de déterminer dans quelle mesure les modifications de prolifération et de morphologie observées sont dues à l'expression des gènes (TnI et endostatine) dont les effets sont évalués sur les lignées cellulaires d'ostéosarcome et d'endothélium capillaire.

III – 1 – 1. Lignée de cellules d'ostéosarcome

Les cellules d'ostéosarcome humain (1547) ont un profil de croissance classique, qui peut être décomposé en trois phases : une phase de latence de 36 h, une phase de croissance exponentielle et une phase d'arrêt de croissance. Cette lignée possède un temps de doublement inférieur à 20 h, indiquant un mécanisme de prolifération cellulaire très actif. Ces cellules atteignent l'état de confluence et arrêtent de proliférer 5 jours après leur ensemencement à la densité de 5000 cellules/cm². Elles peuvent même à ce stade se chevaucher et former parfois un tapis cellulaire à plusieurs couches. Un tel état de confluence peut se maintenir 24 h, puis les cellules meurent et se détachent du support de culture.

III – 1 – 2. Lignée de cellules endothéliales capillaires

Les cellules endothéliales capillaires (EJG) que nous utilisons, présentent une prolifération et une morphologie un peu particulières qui sont typiques des cellules endothéliales.

III – 1 – 2 – 1. Prolifération des cellules EJG

Le profil de croissance des cellules EJG est composé de trois phases : une phase de latence dont la durée est de 72 h, une phase de prolifération et un arrêt de croissance. Ces cellules prolifèrent lentement, leur temps de doublement est de 72 h, une durée de culture de 15 à 18 jours est nécessaire pour atteindre l'état de confluence.

Comme les cellules endothéliales *in vivo*, la prolifération des cellules EJG peut être stimulée par l'adjonction dans le milieu de culture de facteurs de croissance spécifiques. Afin de reproduire au mieux la situation de prolifération rencontrée durant l'angiogenèse *in vivo*, la croissance des cellules EJG est stimulée par le b-FGF. Des courbes de sensibilité des cellules EJG au b-FGF sont réalisées afin de déterminer la concentration en facteur de croissance nécessaire pour obtenir une stimulation de la croissance des cellules endothéliales (Figure R14).

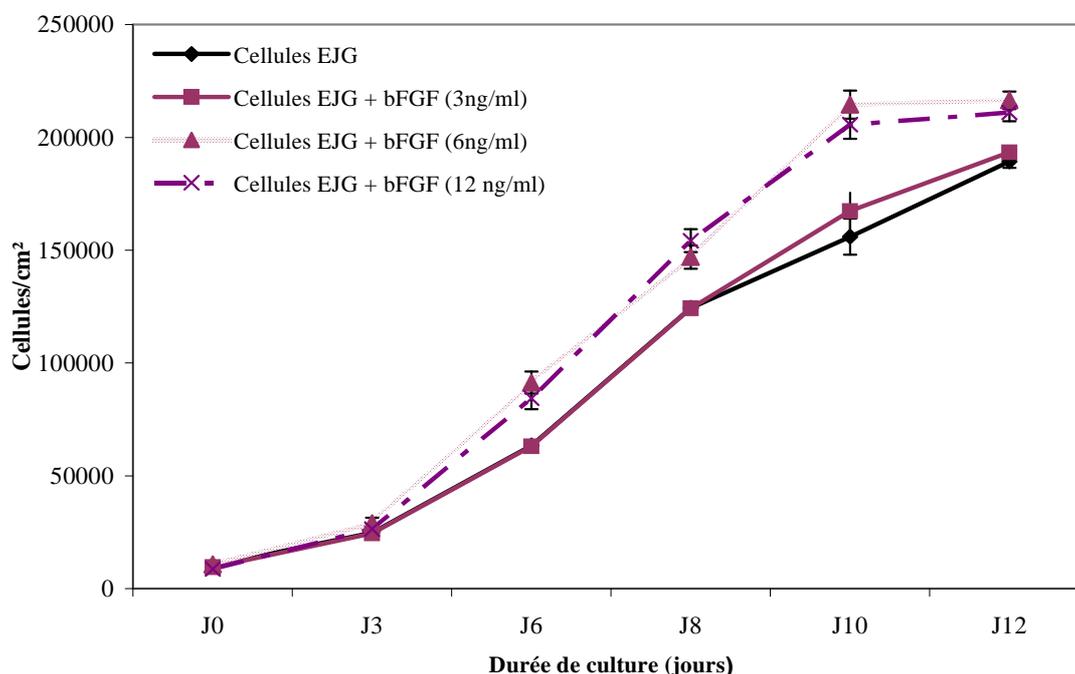


Figure R14 : Courbes de croissance comparatives des cellules EJG parentales et stimulées par des concentrations croissantes de b-FGF.

Les numérations cellulaires sont effectuées tous les deux à trois jours par le test d'exclusion au bleu trypan.

Le profil de croissance des cellules dont la prolifération est stimulée par le b-FGF, présenté sur la Figure R14 est identique à celui des cellules parentales (non stimulées): les cellules stimulées par l'adjonction de b-FGF présentent une phase stationnaire de trois jours puis une phase exponentielle de croissance et une phase d'arrêt de croissance. Alors que la concentration de 3 ng/ml n'apporte aucune stimulation de croissance par rapport aux cellules « témoins », les résultats de cette étude indiquent qu'une concentration de 6ng/ml de b-FGF est suffisante pour stimuler la croissance des cellules EJG de 40% en fin de croissance. Cette concentration de 6 ng/ml est la limite à partir de laquelle la stimulation de la croissance est toujours la même. C'est donc celle que nous avons choisi d'utiliser pour stimuler la prolifération des cellules EJG au cours de toutes les expériences menées sur les modèles de culture cellulaire.

III – 1 – 2 – 2. Morphologie des cellules EJG

Ces cellules se présentent sous forme de cellules polygonales irrégulières (forme étoilée et étalée) en début de prolifération (Figure R15A). A un stade de croissance avancé, les cellules prennent une forme fusiforme, elles s'organisent en fibres orientées parallèlement et présentent l'aspect d'une monocouche fusiforme à confluence (Figure R15B).

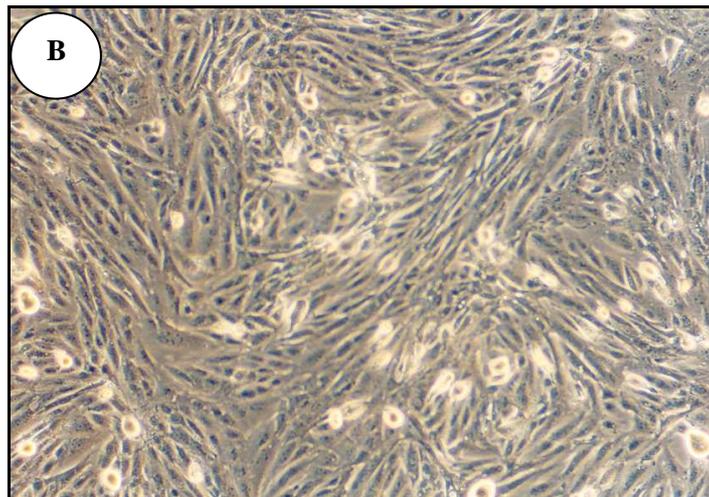
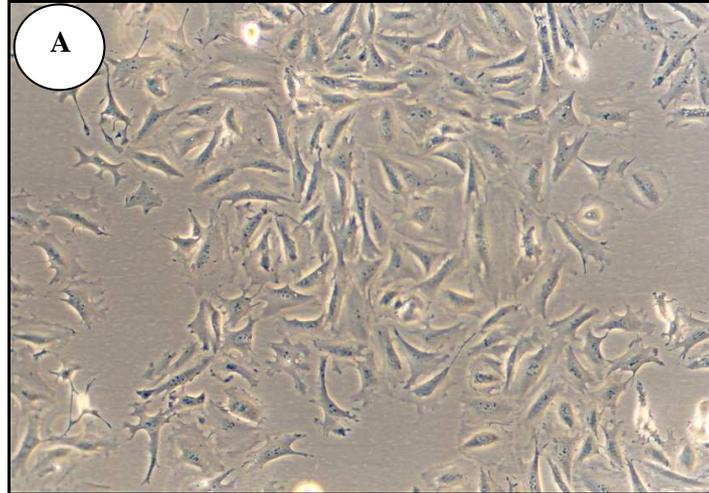


Figure R15 : Morphologie des cellules EJC

A : Cellules EJC 36 h après leur ensemencement à une densité de 8000 cellules /cm². Les cellules ont une forme étoilée. (Grossissement x 100).

B : Cellules EJC 15 jours après leur ensemencement à une densité de 8000 cellules /cm. Les cellules forment une monocouche fusiforme et sont organisées de façon parallèle. (Grossissement x 100).

III – 2. Transfection par les liposomes cationiques: étude de l'incorporation des liposomes par les cellules en culture

Cette étape permet de déterminer quelle doit être la durée de l'incubation des cellules en présence des liposomes. Les deux lignées cellulaires sont transfectées par des liposomes marqués à la rhodamine (LiporedTM). Ce marquage, permet de suivre, en microscopie de fluorescence, l'internalisation des liposomes par les cellules, de déterminer le temps de contact nécessaire entre les liposomes et les cellules pour que les liposomes commencent à être internalisés par les cellules.

Pour les deux lignées cellulaires (1547 et EJG), trois temps d'incubation des liposomes sont testés : 20 min, 1h et 2h. Les photos présentées sur la Figure R16 sont réalisées après 20 min et 1h d'incubation en présence de la solution de LiporedTM .

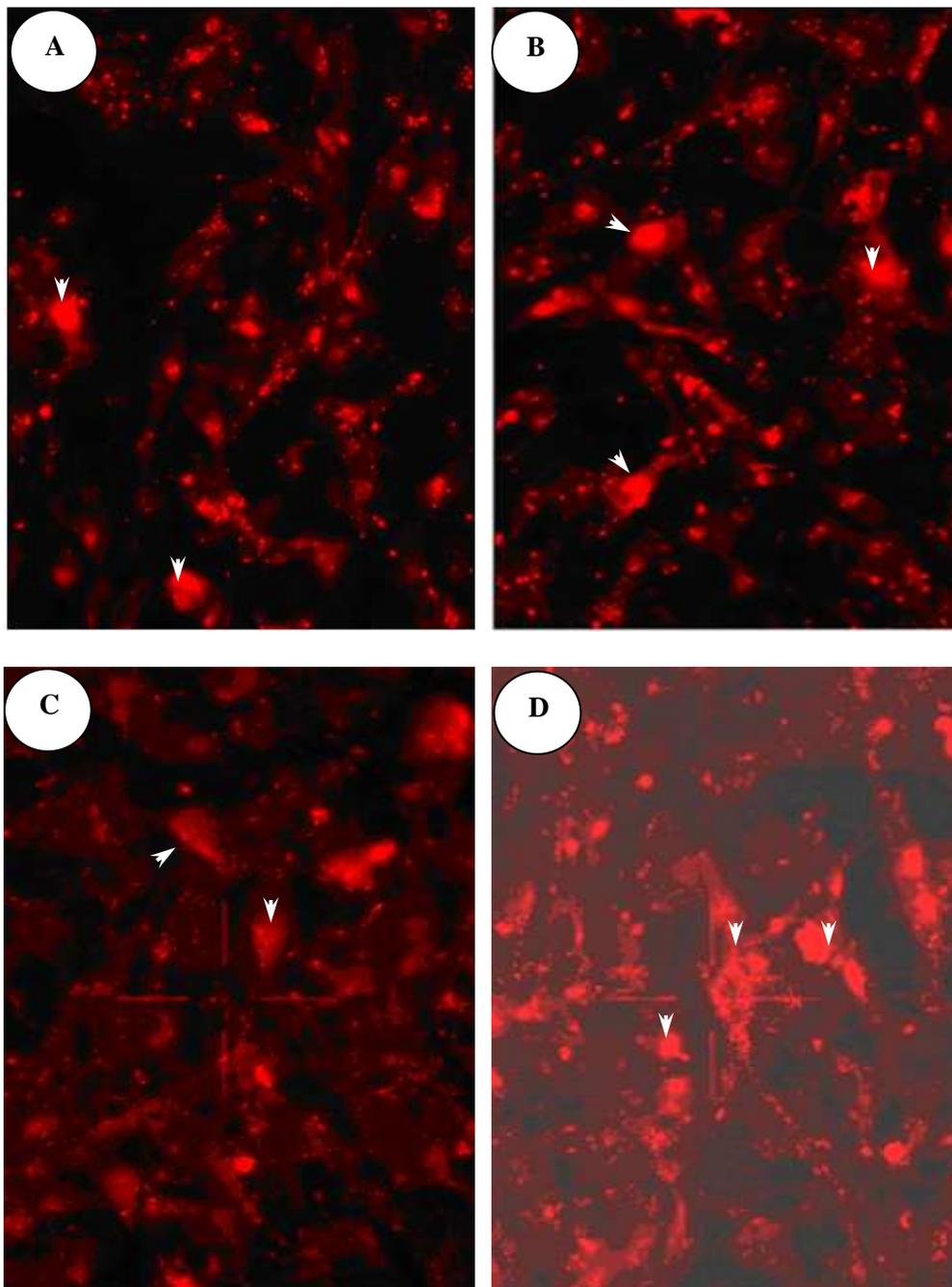


Figure R16 : Incorporation des liposomes marqués par la rhodamine en microscopie de fluorescence.

Une fluorescence plus intense est observée après une incubation d'une heure (flèches).

A et B: Internalisation des liposomes par les cellules 1547 ; **A** : 20 min après le début de la transfection ; **B** : 1 h après le début de la transfection (grossissement x 200). **C et D:** Internalisation des liposomes par les cellules EJG ; **C** : 20 min après le début de la transfection ; **D** : 1 h après le début de la transfection (grossissement x 200).

Une fluorescence intracytoplasmique est observée dès 20 min d'incubation en présence des liposomes montrant que ces derniers sont rapidement internalisés par les cellules (Figure R16A et R16C). Cette fluorescence s'intensifie au cours du temps et se déplace du cytoplasme vers la membrane nucléaire. Au terme d'une heure d'incubation l'intensité de la fluorescence intracellulaire est à son maximum (Figure R16B et R16D). Une durée d'incubation de deux heures n'entraîne pas une fluorescence intracellulaire plus intense. Ceci semble indiquer l'existence d'un phénomène de saturation de la part des cellules qui n'incorporent plus de liposomes. Ces résultats sont observés pour les cellules 1547 aussi bien que pour les cellules EJM indiquant que la vitesse d'incorporation des liposomes et le phénomène de saturation observés ne sont pas dépendants de la lignée cellulaire, mais plus des caractéristiques physicochimiques des liposomes.

En fonction de ces résultats la durée de la transfection des cellules par les liposomes ou lipoplexes est fixée à 1h, temps à l'issue duquel le milieu de culture contenant les liposomes est remplacé par du milieu de culture normal.

III – 3. Effet des ADNc de l'endostatine et de la TnI sur les cellules 1547

Une gamme de concentration des différents lipoplexes allant de 1 à 10 μg d'ADN/ml de milieu de culture est utilisée pour transfecter les cellules 1547 en phase de prolifération. Les effets des gènes d'intérêt sur la prolifération des cellules 1547 sont évalués par la comparaison de la croissance des cellules transfectées par les lipoplexes à celle des cellules transfectées par les liposomes « vides ». Cette transfection de « référence » permet de déterminer dans quelle mesure et à partir de quelle concentration, les liposomes ont un éventuel effet délétère sur les cellules 1547.

Les effets potentiels des gènes antiangiogéniques sur la croissance des cellules 1547 sont évalués à différents temps après la transfection (de 24 à 72 h), par comptage au bleu trypan (Figure R17).

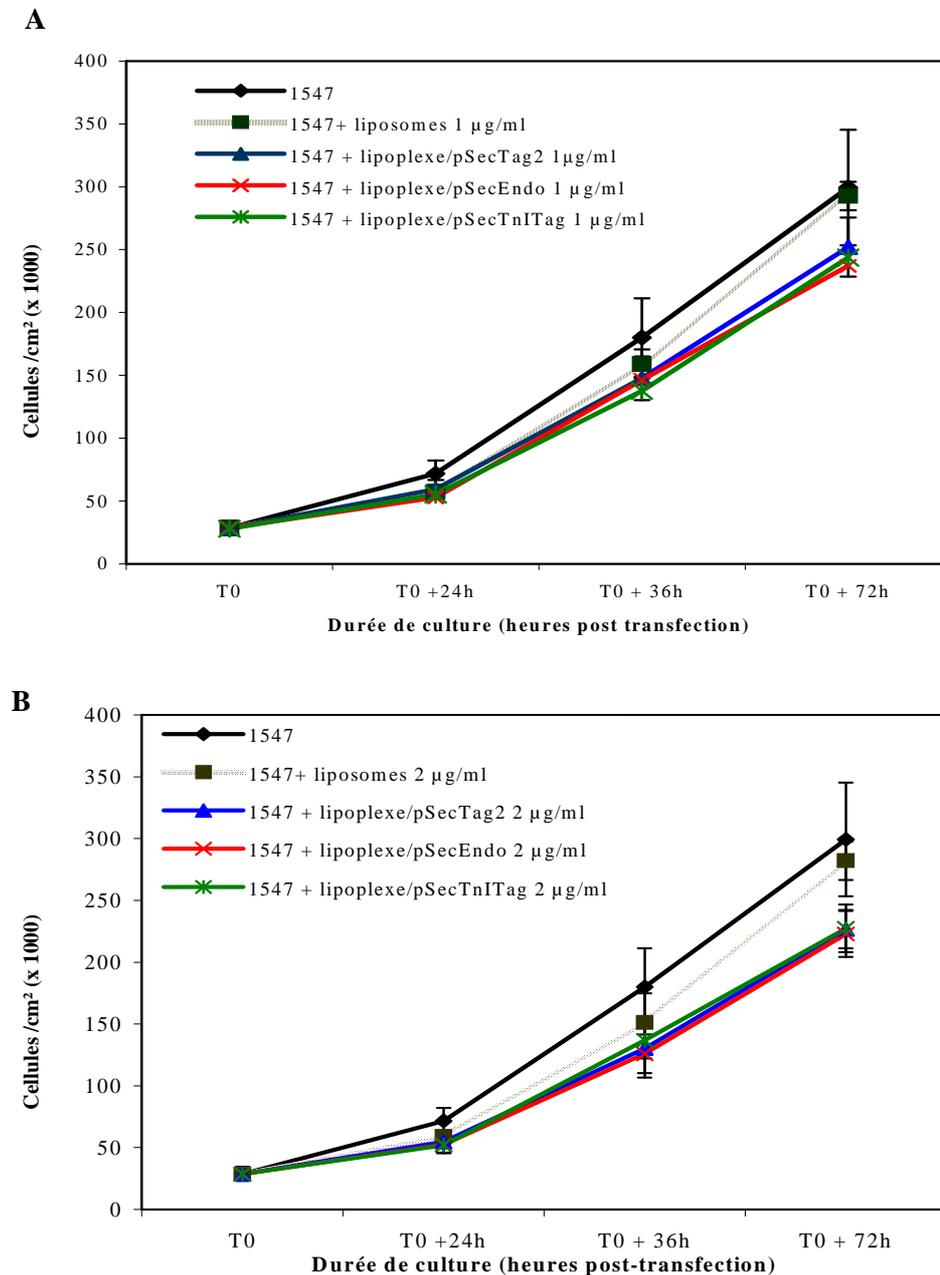


Figure R17 : Courbes de croissance comparative des cellules 1547 parentales et transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.

La prolifération des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu trypan ,24h, 36h et 72 h. La transfection réalisée à T0. **A** : transfection par 1 µg ADN/ml de milieu de culture **B** : transfection par 2 µg ADN/ml de milieu de culture.

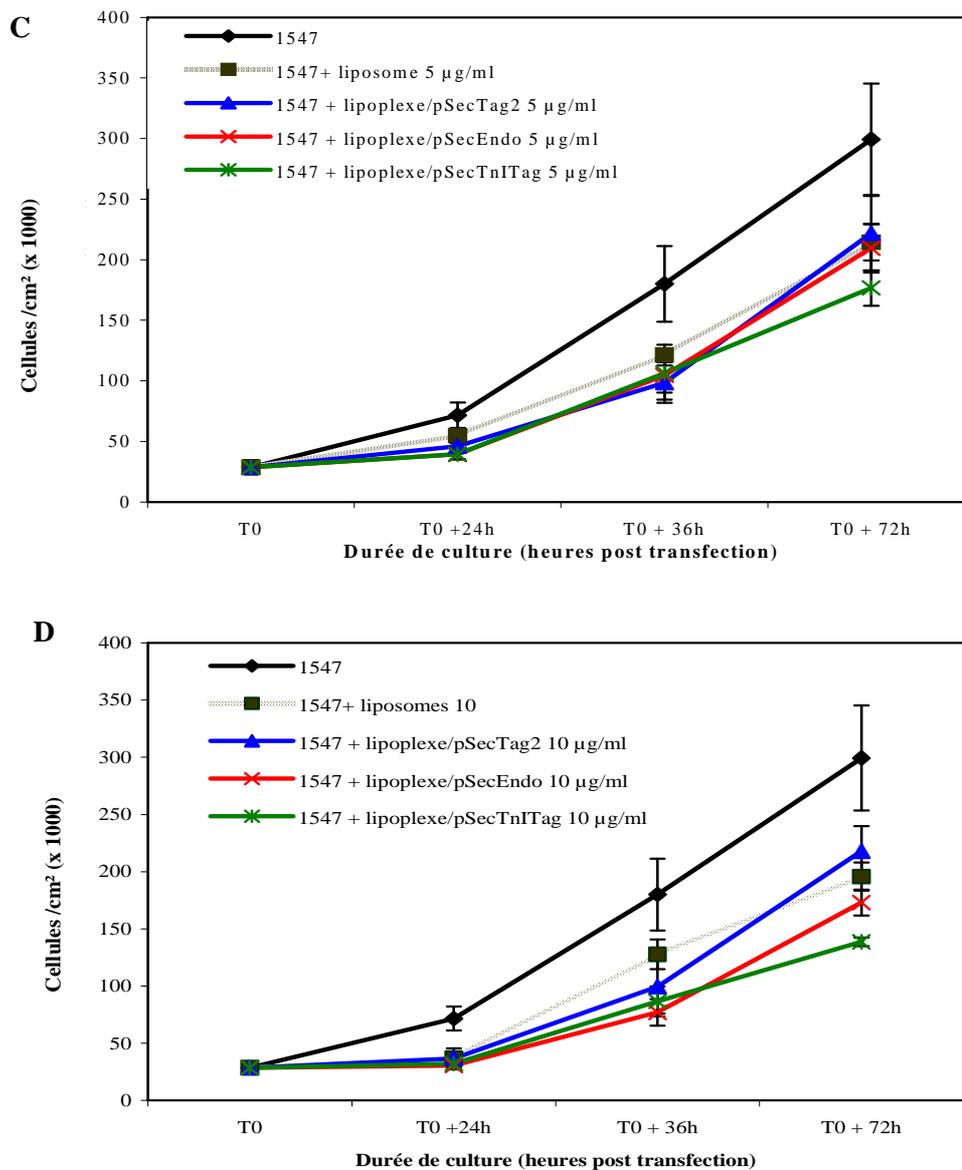


Figure R17 (suite) : Courbes de croissance comparative des cellules 1547 parentales et transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.

Une gamme de concentration allant de 1 à 10 µg d'ADN/ml de lipoplexes est utilisée pour transfecter les cellules 1547. La prolifération des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu trypan, 24h, 36h et 72 h, après la transfection réalisée à T0. (n = 10comptages)

C: transfection par 5 µg ADN/ml de milieu de culture ; **D :** transfection par 10 µg ADN/ml de milieu de culture.

La Figure R17 indique qu'aucun ralentissement de croissance significatif n'est observé lorsque des concentrations de 1 et 2 µg d'ADN/ml de milieu de culture sont appliquées pour la transfection des cellules 1547 (Figure R17A et B). La différence de croissance notée entre les cellules parentales et transfectées les liposomes ou par les lipoplexes n'est pas significative à cette concentration de 2 µg /ml ($p > 0,05$ à T0 +36 h, Figure R17B). De plus, la croissance des cellules 1547 n'est pas affectée après la transfection par les lipoplexes/pSecEndo ou pSecTnITag par rapport aux cellules transfectées par les liposomes vides ($p > 0,05$ à T0 + 36 h). Les protéines codées par ces plasmides recombinants n'exercent pas d'effet inhibiteur sur la prolifération des cellules 1547.

Un ralentissement important de la croissance est constaté lorsque les cellules sont transfectées avec des concentrations plus élevées de lipoplexes (5 µg d'ADN/ml de milieu de culture). Ce retard de croissance n'est pas du à l'expression des gènes d'intérêt, mais plutôt imputable à un effet des liposomes sur les cellules. En effet, un ralentissement de croissance de 31% par rapport aux cellules parentales est noté lorsque les liposomes cationiques vides sont utilisés pour transfecter les cellules 1547, mais aucun ralentissement de croissance n'est noté entre les cellules transfectées par les lipoplexes/pSecEndo ou pSecTnITag (Figure R17C et R17D). Dans ce cas, l'inhibition de la croissance des cellules 1547 observée, n'est pas due à l'expression des gènes antiangiogéniques étudiés, mais à la transfection elle-même. Appliqués à cette concentration les liposomes ont un effet délétère sur la prolifération des cellules. L'absence d'effet inhibiteur des protéines endostatine et TnI sur les cellules 1547 est nettement mise en évidence.

Les cellules reprennent une vitesse de croissance normale 72h après avoir été transfectées à l'aide des différents lipoplexes mettant en évidence le caractère transitoire de la lipofection.

III – 4. Effet des ADNc de l'endostatine et de la TnI sur les cellules EJG.

III – 4 – 1. ADNc et croissance cellulaire

Les cellules EJG en phase de prolifération, sont transfectées à l'aide des mêmes lipoplexes que les cellules 1547, utilisés dans la même gamme de concentration.

Les profils de croissance des cellules EJG après transfection sont différents de ceux observés dans les mêmes conditions pour les cellules d'ostéosarcome et sont présentés sur la Figure R18.

La croissance des cellules endothéliales est affectée de manière spécifique par l'expression des gènes étudiés. La croissance de ces cellules n'est pas ralentie de manière significative après une transfection par les liposomes ou les lipoplexes/pSecTag2 à des concentrations de 1 et 2 µg/ml. Seules les cellules EJG transfectées dans les mêmes concentrations de lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag, voient leur croissance inhibée de manière significative. Une inhibition de croissance de 40 % et de 57 % est notée 36 h après la transfection des cellules par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag respectivement (Figure R18A et R18B). Cette inhibition est calculée par rapport à la croissance des cellules EJG transfectées par la même concentration de liposomes vides et est significative ($p < 0,05$ à T0+36 h). Cet effet inhibiteur est dépendant de la concentration d'ADN utilisé pour réaliser la transfection : en augmentant la concentration d'ADN, l'inhibition de la croissance des cellules EJG est augmentée.

Comme pour les cellules 1547, un effet délétère des liposomes sur la prolifération des cellules EJG est également observé à partir d'une concentration de lipoplexes de 5 µg d'ADN/ml (Figure R18C et R18D). Comme les cellules 1547, les cellules EJG reprennent une croissance normale 72 h après la transfection, échappant à l'expression des gènes d'intérêt. La transfection par les liposomes cationiques permet une expression suffisante des gènes

d'intérêt pendant 48 h et une efficacité maximale est notée 36 h après la transfection, ces durées apparaissent comme étant des caractéristiques intrinsèques des liposomes que nous utilisons.

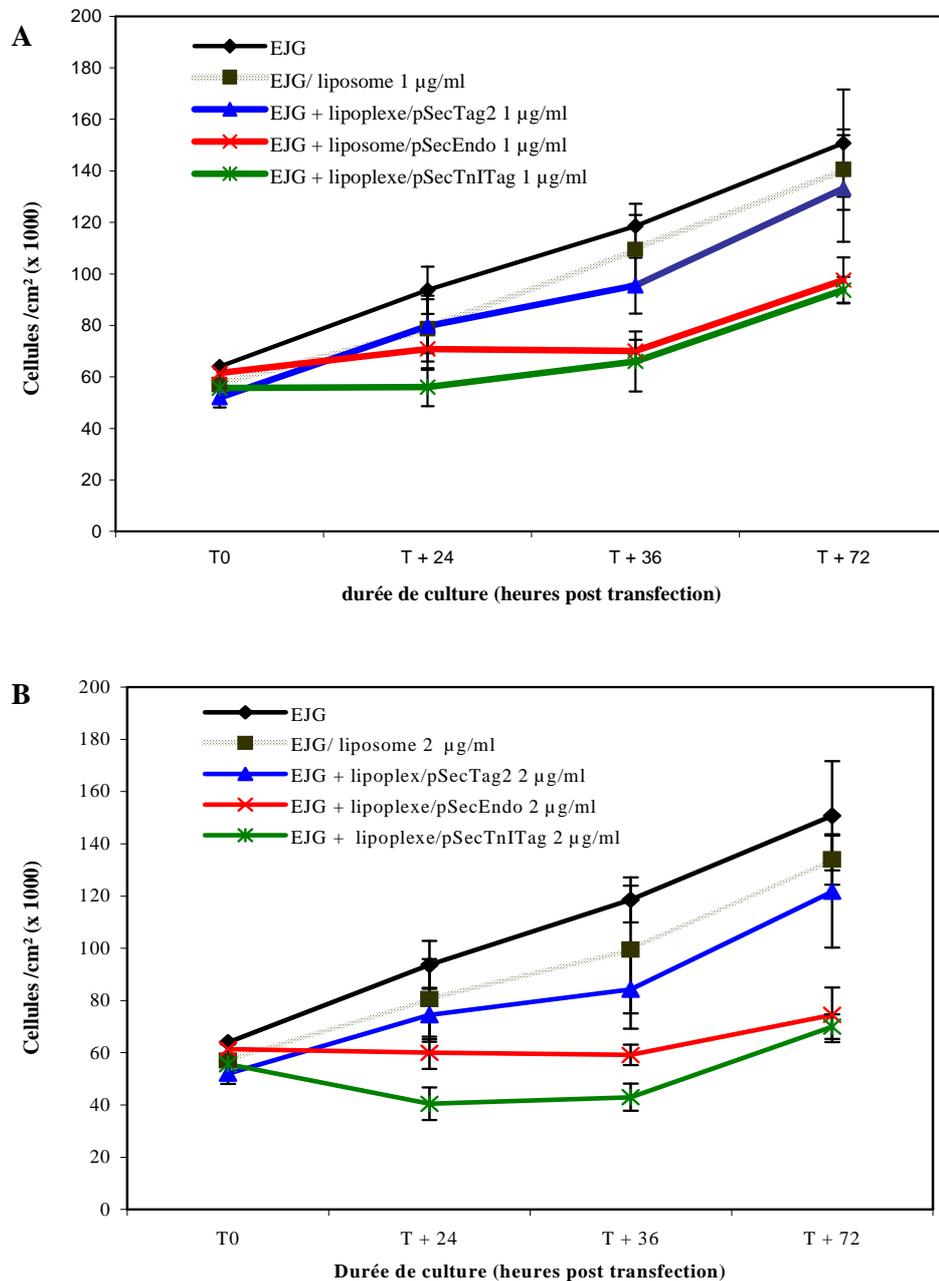


Figure R18 : courbes de croissance comparative des cellules EJM transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.

Une gamme de concentration allant de 1 à 10 µg d'ADN/ml de lipoplexes est utilisée pour transfecter les cellules EJM. La prolifération des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu trypan, 18h, 36h et 72 h, après la transfection réalisée à T0. (n = 10 comptages) **A** : transfection par 1 µg ADN/ml de milieu de culture, **B** : transfection par 2 µg ADN/ml de milieu de culture.

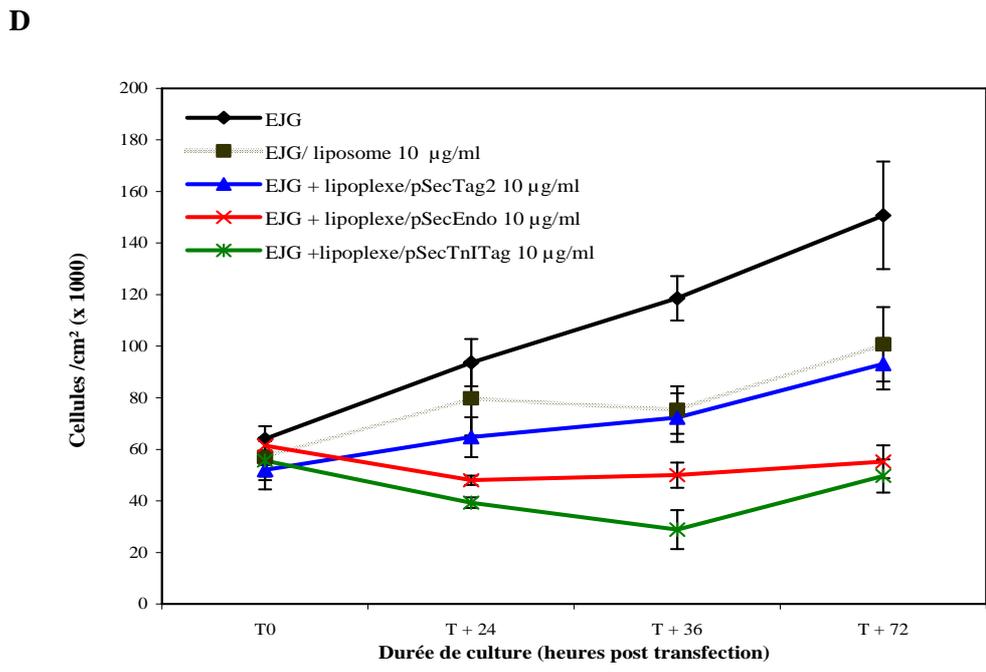
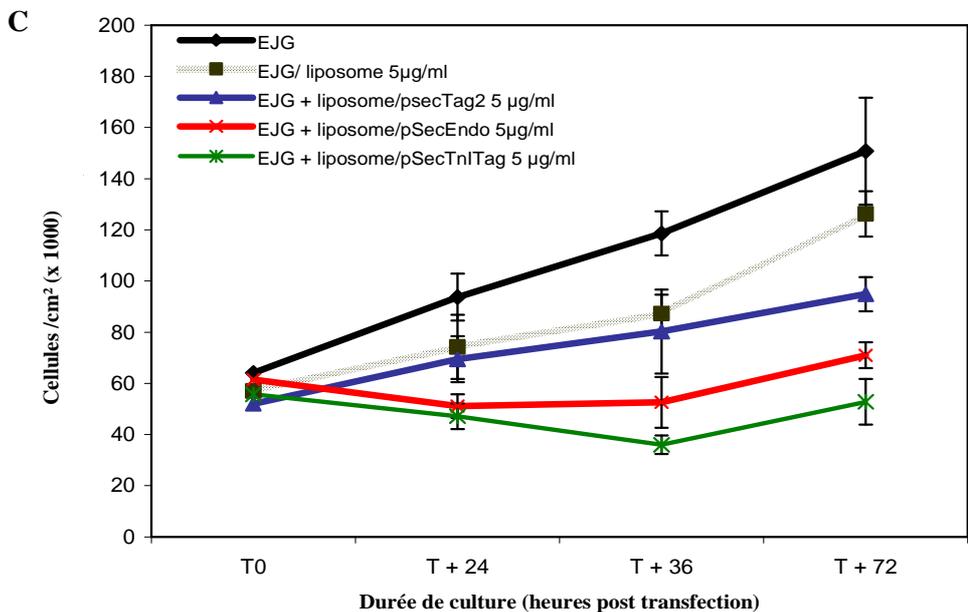


Figure R18 (suite) : courbes de croissance comparative des cellules EJG transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.

Une gamme de concentration allant de 1 à 10 µg d'ADN/ml de lipoplexes est utilisée pour transférer les cellules EJG. La prolifération des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu trypan, 24 h, 36 h et 72 h, après la transfection réalisée à T0. **C** : transfection par 5 µg ADN/ml de milieu de culture, **D** : transfection par 10 µg ADN/ml de milieu de culture

Afin de confirmer l'action antiangiogénique des gènes étudiés, une transfection est réalisée dans les mêmes conditions sur une autre lignée de cellules endothéliales: les cellules HUVEC.

Une concentration de 2 µg/ml de lipoplexes a un pouvoir délétère sur la prolifération de ces cellules. L'analyse est donc réalisée en transfectant ces cellules par une quantité de lipoplexe correspondant à 1 µg d'ADN/ml de milieu de culture.

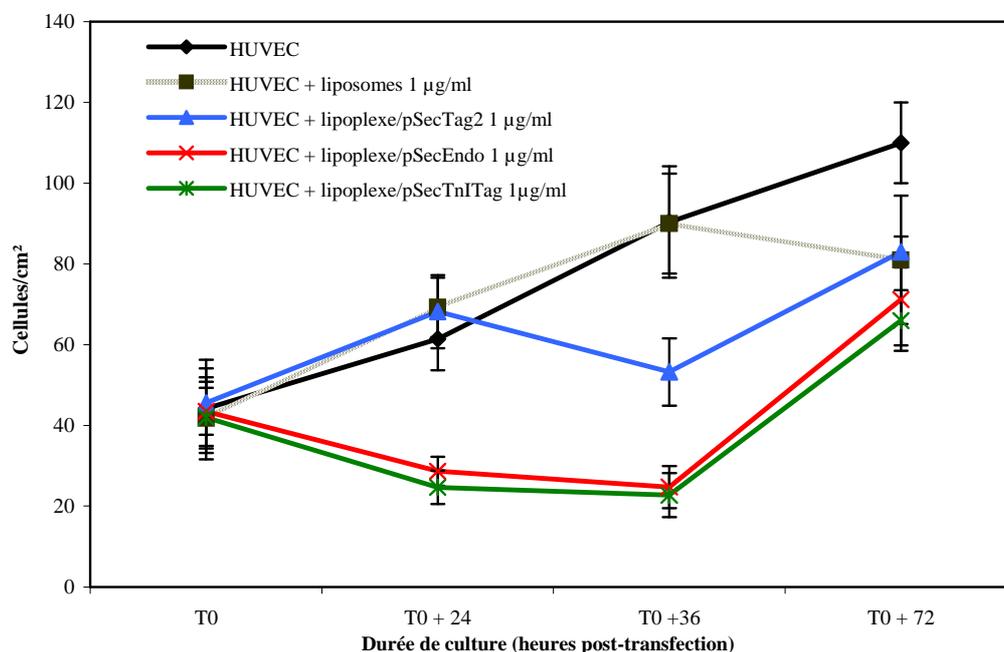


Figure R19 : Courbes de croissance comparatives des cellules HUVEC transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes/pSecTag2, pSecEndo, pSecTnITag.

Les cellules HUVEC sont transfectées par les lipoplexes utilisés à une concentration de 1 µg ADN/ml de milieu de culture. La prolifération des cellules est estimée par le test d'exclusion au bleu trypan, 24h, 36 h et 72 h, après la transfection réalisée à T0. (n = 10 comptages).

La croissance de ces cellules est inhibée par l'introduction d'un ADN exogène comme le montre la courbe de croissance de cellules transfectées par les lipoplexes/pSecTag2. Nous pouvons cependant noter que les deux gènes utilisés exercent également une inhibition de croissance significative et temporaire sur ces cellules (Figure R19) ($p < 0,05$ à T0 + 36 h). La

comparaison est réalisée entre les cellules transfectées par les lipoplexes/pSecTag2 et celles transfectées par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag.

Il ressort de ces essais que les deux gènes étudiés possèdent une action inhibitrice spécifique des cellules endothéliales, puisque *in vitro* ils inhibent uniquement la croissance des cellules EJV et HUVEC. De plus, la TnI a une action antiproliférative *in vitro* plus importante que l'endostatine. A concentration égale l'inhibition de croissance entraînée par la TnI est supérieure ou égale à celle induite par l'endostatine (Tableau R1).

	Lipoplexes/ pSecEndo 1 µg/ml	Lipoplexes/ pSecTnITag 1 µg/ml	Lipoplexes/ pSecEndo 2 µg/ml	Lipoplexes/ pSecTnITag 2 µg/ml
Inhibition de la croissance des cellules EJV 36 h après la transfection	37%	40%	40%	57%

Tableau R1 : Inhibition de croissance des cellules endothéliales capillaires EJV 36 h après leur transfection par les lipoplexes.

L'inhibition de croissance observée est exprimée en pourcentage par rapport à la croissance des cellules endothéliales (EJV) transfectées par la même concentration de liposomes. Un léger effet dose dépendant est noté. Il ressort de ces analyses qu'*in vitro* la TnI est un inhibiteur de la prolifération des cellules EJV plus efficace que l'endostatine : à concentration égale, les lipoplexes/pSecTnITag entraînent un retard de croissance égal ou plus important que les lipoplexes/pSecEndo.

III – 4 – 2. Détection de l'apoptose des cellules EJK après transfection par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag

L'endostatine et la TnI provoquent provisoirement un ralentissement de la croissance des cellules endothéliales. Ces deux gènes vont-ils agir par régulation du cycle cellulaire ou sont-ils des inducteurs de mort cellulaire ? La capacité de l'endostatine à induire *in vitro* l'apoptose des cellules endothéliales est connue (Dhanabal *et al.*, 1999b, Dhanabal *et al.*, 1999c). Nous avons utilisé une technique de double marquage afin d'évaluer l'apoptose cellulaire après la transfection par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag.

III – 4 – 2 – 1. Morphologie des cellules après transfection

Les cellules EJK sont transfectées par les lipoplexes utilisés à 2 µg/ml, cette concentration apparaissant comme la concentration limite où un effet délétère des liposomes vides sur la prolifération des cellules n'est pas observé.

Les cellules EJK transfectées par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag, présentent de grands changements morphologiques dès 18 h après la transfection (Figure R20).

Le tapis cellulaire est détruit, des plages de cellules ont disparues, de nombreux débris cellulaires sont présents dans le milieu. La membrane plasmique des cellules présente un aspect dentelé, le cytoplasme des cellules est abondant, cette morphologie rappelle celle des cellules en état de lyse. Ces effets sont également observés mais dans une plus faible proportion pour les cellules transfectées par les liposomes ou les lipoplexes/pSecTag2. Alors que 5 % et 10 – 15 % environ des cellules transfectées respectivement par les liposomes ou les lipoplexes/pSecTag2 présentent cette morphologie ; ces pourcentages de cellules modifiées atteignent 30 à 50% des cellules transfectées par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag. Ces modifications sont pour une part dues à l'incorporation forcée dans la

cellule de nouveaux lipides, mais ils sont augmentés par l'expression des gènes antiangiogéniques.

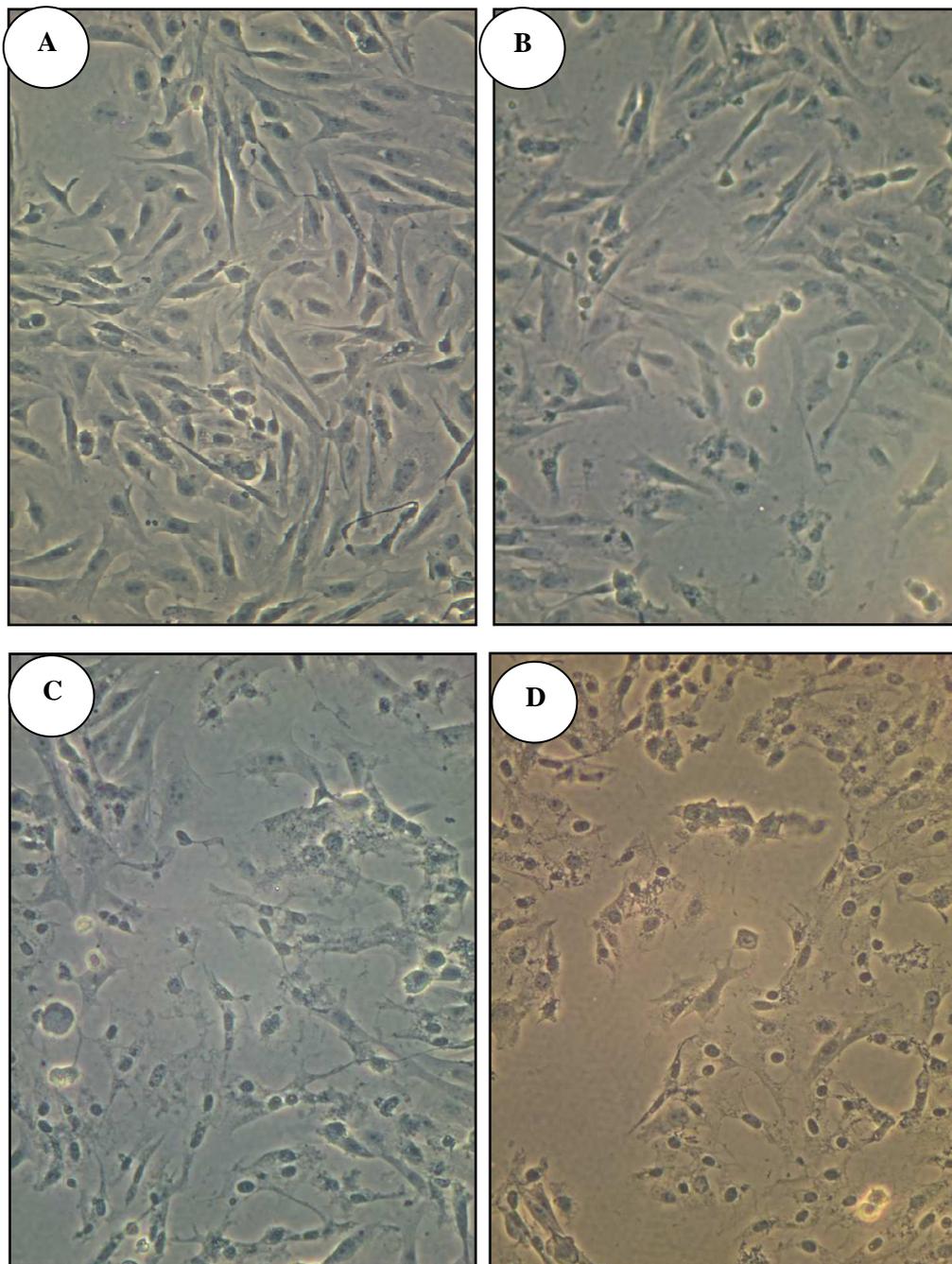


Figure R20 : Morphologie des cellules EJM 18 h après la transfection par les lipoplexes.

Les cellules EJM sont transfectées par les lipoplexes administrés à une concentration de 2 $\mu\text{g/ml}$. (Grossissement x 100).

A : cellules EJM parentales, **B** : cellules EJM transfectées par les lipoplexes pSecTag2, **C** : cellules EJM transfectées par les lipoplexes/pSecEndo, **D** : cellules EJM transfectées par les lipoplexes/pSecTnITag.

III – 4 – 2 – 2. Détection de l'apoptose des cellules après transfection

Bien que les caractéristiques morphologiques observées soient plutôt celles de la nécrose, tenant compte de l'activité pro-apoptotique de l'endostatine, une double coloration T.U.N.E.L./DAPI est réalisée. Elle permet de visualiser les noyaux cellulaires de toutes les cellules (coloration au DAPI) et de détecter d'éventuelles fragmentations nucléaires caractéristiques de l'apoptose (coloration DAPI et T.U.N.E.L.). Les résultats de cette double coloration sont présentés sur la Figure R21. Cette coloration permet de visualiser sous microscopie à fluorescence les noyaux des cellules apoptotiques.

Les noyaux des cellules non transfectées ou transfectées par les liposomes ne présentent pas de double marquage (Figure R21A). Quelques cellules transfectées par les lipoplexes/pSecTag2 ont une double coloration nucléaire. Environ 30 % des cellules transfectées par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag ont des noyaux cellulaires présentant un double marquage T.U.N.E.L. et DAPI (Figure R21 B et R21C). Bien que des structures typiques de fragmentations nucléaires ne puissent pas être reconnues, cette double fluorescence est l'indication de mort cellulaire vraisemblablement par apoptose. Il apparaît donc qu'*in vitro*, les deux gènes évalués peuvent induire une mort par apoptose des cellules EJG.

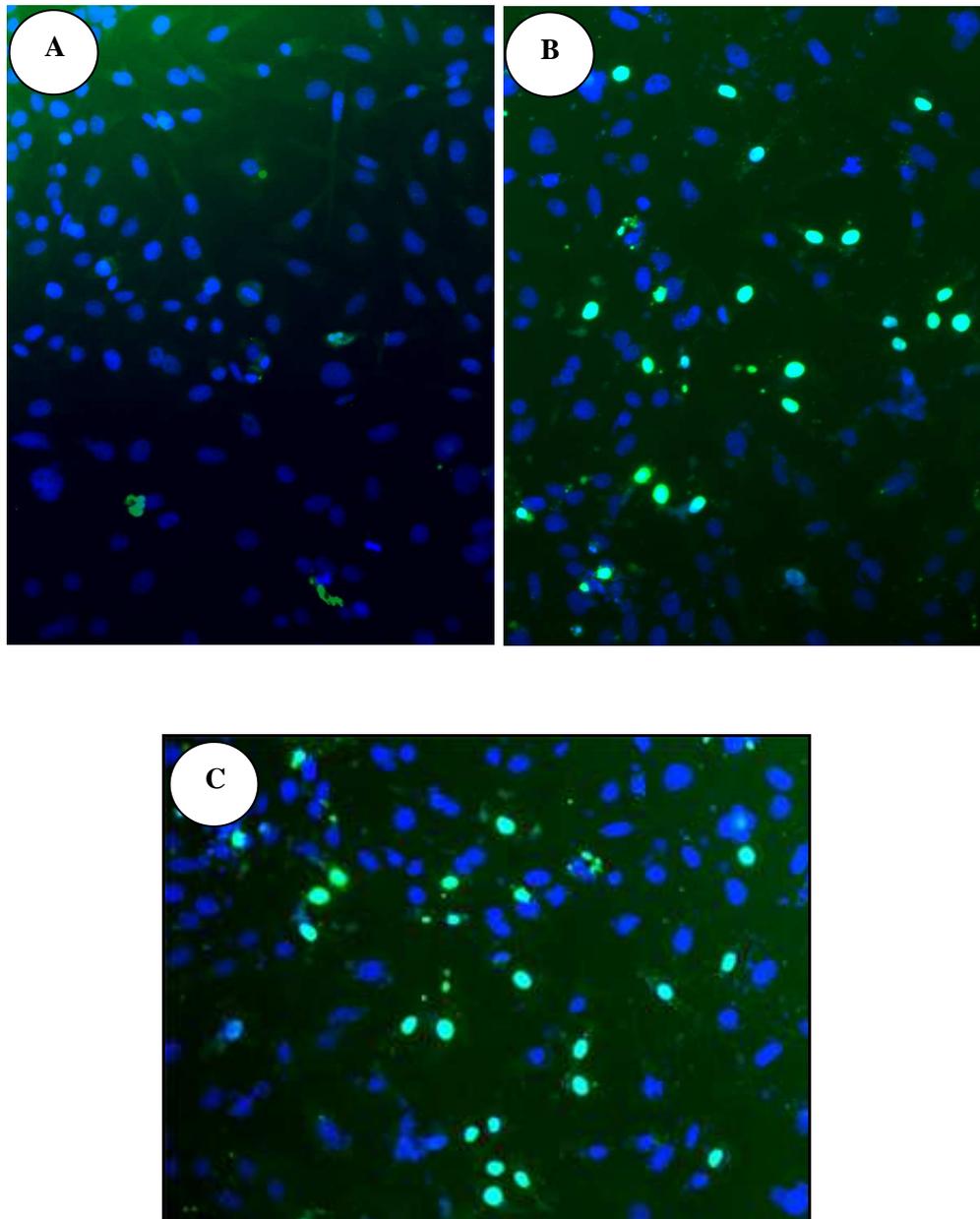


Figure R21 : Observation en microscopie de fluorescence après coloration nucléaire des cellules EJG par double marquage T.U.N.E.L./DAPI.

Les cellules EJG sont transfectées par les lipoplexes utilisés à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La détection de l'apoptose est réalisée 18 h après la transfection.

A : Cellules EJG non transfectées, **B** : Cellules EJG transfectées par les lipoplexes/pSecEndo, **C** : Cellules EJG transfectées par les lipoplexes/pSecTnITag. (Grossissement x 200)

Cette phase expérimentale *in vitro* a permis de mettre en évidence que les gènes d'intérêt étudiés sont des agents inhibiteurs spécifiques de la prolifération des cellules endothéliales, en effet l'expression de ces gènes n'affecte pas la prolifération des cellules d'ostéosarcome. Il apparaît de plus qu'*in vitro* l'endostatine et la TnI sont des agents inducteurs de l'apoptose des cellules EJM. Une comparaison de l'activité antiangiogénique de ces deux gènes réalisée sur des modèles de cultures cellulaires indique qu'*in vitro* la troponine I est un inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales plus efficace que l'endostatine.

La transfection de lignées cellulaires par les lipoplexes nous a permis de constater que l'expression des transgènes est stable pendant environ 48 h. Ceci nous permet de fixer la fréquence d'administration des lipoplexes à effectuer. Une injection de lipoplexes, correspondant à une concentration de 240 µg d'ADN, toutes les 48 h à 72 h, nous semble suffisante pour maintenir un niveau d'expression du transgène suffisant pour observer un effet antiangiogénique *in vivo*.

IV. Administration des lipoplexes aux rats porteurs d'ostéosarcome

Les résultats encourageants obtenus lors de la phase d'étude *in vitro*, mettent en évidence la spécificité d'action des deux agents étudiés : l'endostatine et la TnI musculaire.

Au vu de ces résultats, nous avons testé l'efficacité thérapeutique de ces gènes sur un modèle tumoral *in vivo*. Le modèle utilisé est celui de l'ostéosarcome greffable de rat, modèle orthotopique qui possède les mêmes caractéristiques d'agressivité et le fort potentiel métastatique de l'ostéosarcome humain. Les mêmes liposomes cationiques que ceux utilisés *in vitro* sur les modèles de culture cellulaire, servent de vecteur de transfert des ADNc de

l'endostatine et de la TnI *in vivo*. La validité de la thérapie génique utilisant ces vecteurs liposomiques est évaluée, et une étude comparative des actions de l'endostatine et de la TnI est menée. L'appréciation de l'efficacité du traitement antiangiogénique repose sur plusieurs critères : sa capacité à ralentir, voire à inhiber la croissance tumorale, à empêcher la dissémination métastatique, et à induire une réduction de la vascularisation tumorale.

IV – 1. Administration intratumorale des lipoplexes/pSecEndo

Dans une première phase d'étude, les effets de l'administration intratumorale des lipoplexes (correspondant à 240 µg d'ADNc) sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique sont évalués. Ce premier essai ayant pour but de valider la stratégie de thérapie génique antiangiogénique, est réalisé sur six animaux, quatre reçoivent les lipoplexes/pSecEndo et deux rats témoins les lipoplexes/pSecTag2.

Le nombre de rats étudiés ne permet pas de réaliser de tests statistiques. Cependant cette expérience nous a permis de nous assurer de l'absence d'effets indésirables dus à l'injection répétée de lipoplexes dans l'organisme et de tester l'efficacité des ADNc à induire directement une inhibition de croissance tumorale. En administrant les gènes directement dans la tumeur, nous testons leur efficacité et nous limitons les possibilités de diffusion des lipoplexes dans l'organisme. Le gène de l'endostatine, dont l'action antiangiogénique est établie sur de nombreux modèles tumoraux est choisi comme un agent thérapeutique de référence afin de valider la stratégie.

L'efficacité de la thérapie est évaluée tout au long de l'étude par appréciation du volume tumoral calculé selon la formule de Carlsson (Carlsson *et al.*, 1983) (Figure R22).

Les tumeurs des animaux du groupe témoin évoluent rapidement, et ces rats sont sacrifiés cinquante huit jours après le début de la thérapie du fait d'une masse tumorale

imposante. Alors que dans le groupe recevant les lipoplexes/pSecEndo, une régression de la tumeur est observée pour deux animaux respectivement après 16 jours et 37 jours de traitement. La tumeur se présente comme une néoformation mobile à la palpation respectivement de 0,8 cm³ et 0,4 cm³. Cette mobilité laisse supposer que les tumeurs ne sont plus attachées à l'os et peuvent être chirurgicalement excisées sans risque. Une fois le résidu tumoral réséqué, les animaux reçoivent deux injections intratumorales supplémentaires des lipoplexes/pSecEndo par voie intramusculaire, au site correspondant à l'ancien site tumoral. Ces animaux ne présentent pas de signes de récurrence tumorale ni de développement métastatique, même après une période de six mois sans thérapie.

Les deux autres animaux recevant les lipoplexes/pSecEndo ne présentent pas de ralentissement de la croissance tumorale important par rapport aux animaux témoins. Si un retard d'évolution est constaté pour une tumeur, l'autre présente une croissance identique à celle des tumeurs des animaux témoins. Cette évolution peut nous laisser supposer que cette tumeur échappe au traitement antiangiogénique. L'essai est stoppé lorsque les rats témoins sont sacrifiés ; les deux rats ayant reçu les lipoplexes/pSecEndo sont sacrifiés en même temps.

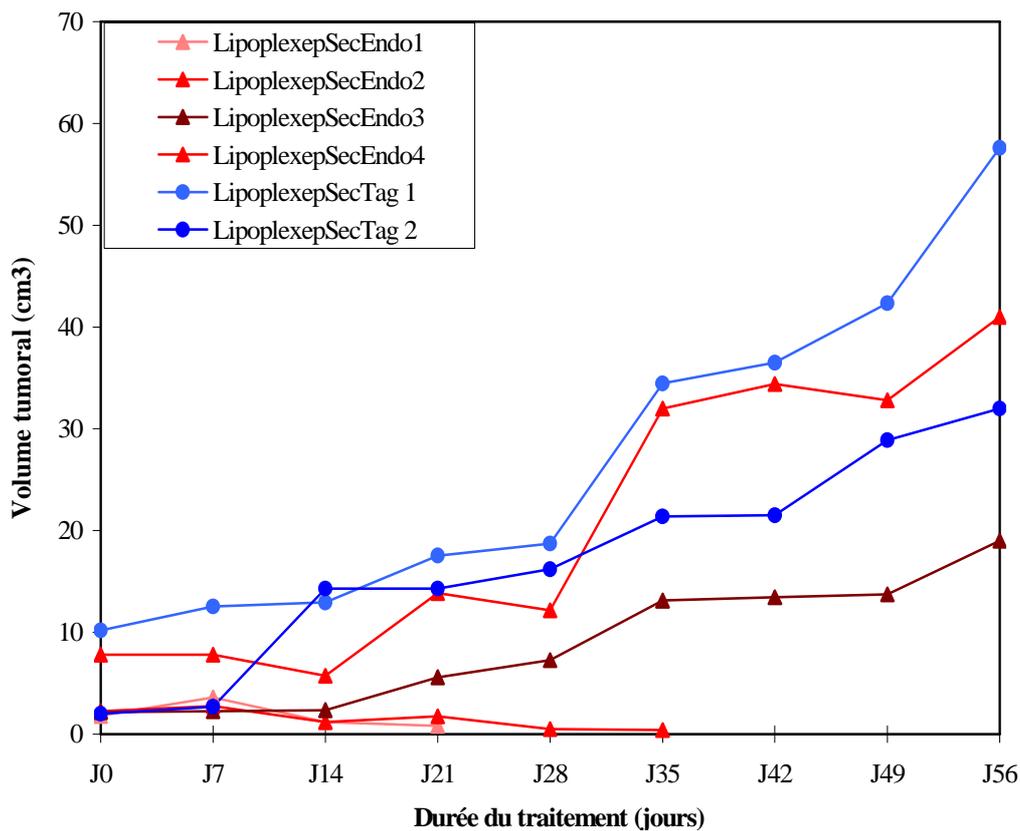


Figure R22 : Evolution des volumes tumoraux au cours du traitement.

Les volumes tumoraux sont appréciés tous les 7 jours, pour chaque animal, à l'aide de la formule de Carlsson. Les rats recevant les lipoplexes/pSecEndo sont représentés en rouge et dénommés selon le traitement reçu Lipoplexe/pSecEndo, les rats témoins sont représentés en bleus et désignés par le nom du lipoplexe contrôle : lipoplexe/pSecTag.

Les tumeurs et poumons de tous les animaux sont soumis à des analyses anatomopathologiques, afin d'étudier la structure histologique des tumeurs primaires et de rechercher la présence de métastases pulmonaires.

L'examen histologique des deux tumeurs ayant régressé montre par la présence au sein du tissu musculaire d'un reliquat tumoral (Figure R23A). Cette structure tissulaire présente les caractéristiques d'une tumeur ayant totalement ou presque complètement régressé. Le reliquat tumoral est composé en grande partie de nécrose faite de tissu conjonctif jeune, de débris cellulaires. Quelques cellules tumorales à noyau atypique sont décelées. La périphérie

de la néoformation est nécrotique et est le siège d'une infiltration inflammatoire (Figure R23B).

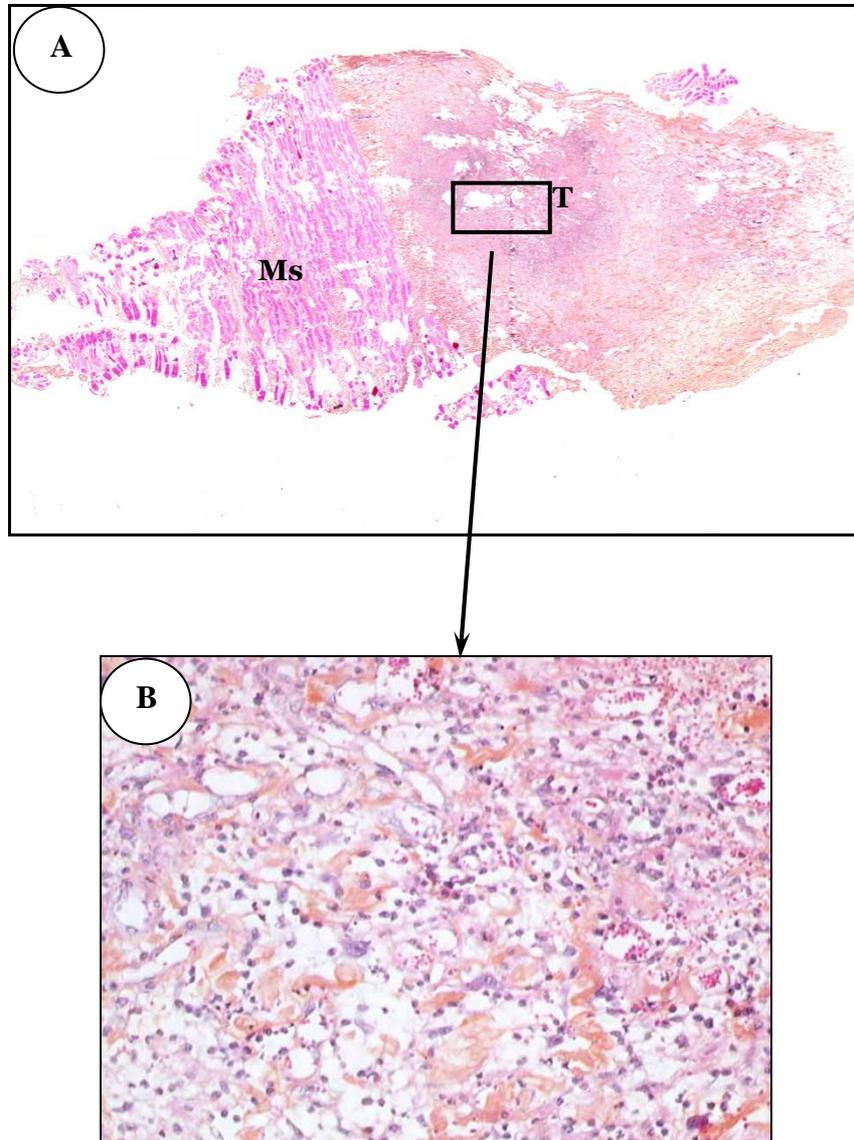


Figure R23 : Analyse histologique d'une tumeur ayant totalement régressée.

A : Lame histologique de la néoformation incluse dans le muscle. **Ms :** Muscle squelettique, **T :** néoformation tumorale.

B : Coupe histologique de la néoformation tumorale, (grossissement x 100).

L'autopsie des animaux sacrifiés révèle la présence de métastases pulmonaires observables macroscopiquement pour les animaux témoins : de 3 à 7 métastases sont décelées, leur taille est comprise entre 0,2 et 1,5 cm de diamètre (Figure R24A). A l'examen histologique, les métastases pulmonaires des animaux témoins montrent un aspect similaire à la tumeur primitive. Le faible pourcentage de nécrose de ces foyers métastatiques, 10% de la surface tumorale secondaire, ainsi que la présence d'embols tumoraux au niveau des artérioles pulmonaires attestent de l'agressivité de cette tumeur (Figure R24B).

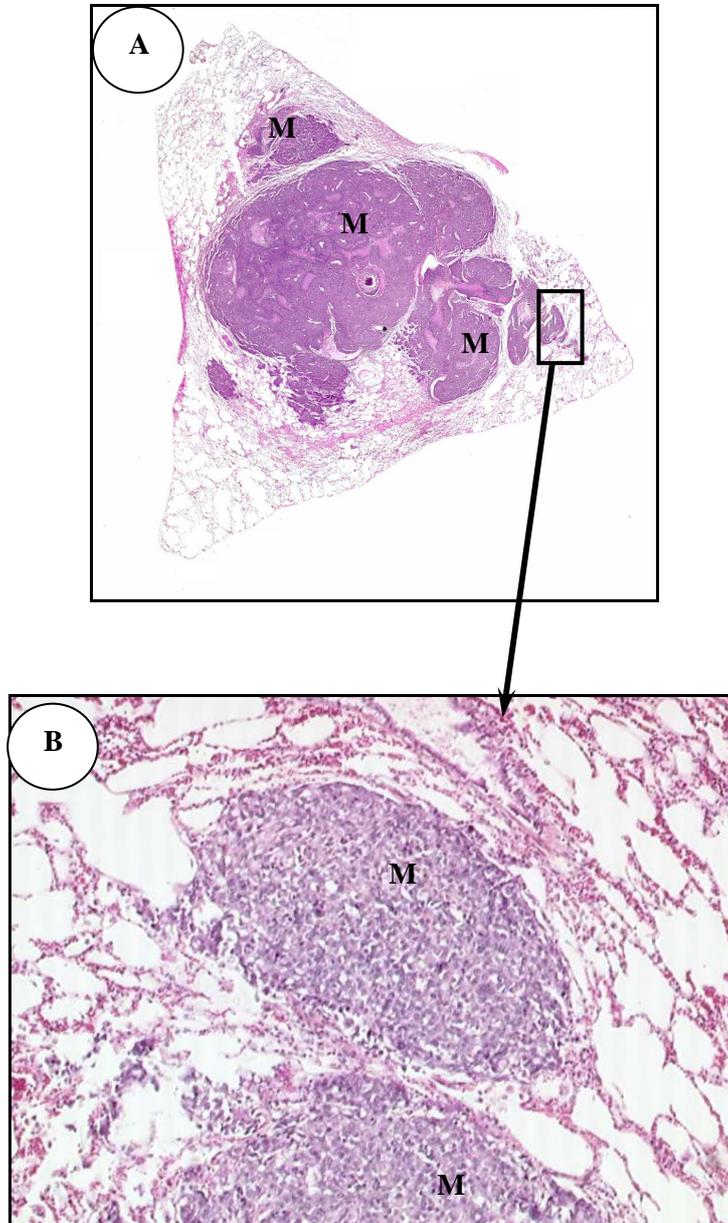


Figure R24 : Analyses histologiques de poumon de rat témoin.

A : Coupe de tissus pulmonaire de rats témoins ; de nombreuses métastases (**M**) sont observées. (Lame scannée).

B : Coupe histologique d'une métastase (grossissement x 100).

Les poumons des animaux ayant reçu le gène de l'endostatine sont dépourvus de tout foyer tumoral secondaire décelable macroscopiquement.

Des analyses anatomopathologiques sont menées sur des coupes tissulaires afin de rechercher la présence d'éventuels foyers tumoraux secondaires pulmonaires microscopiques pour les animaux du groupe pSecEndo. Une structure pulmonaire intacte est observée, aucune métastase n'est détectée, chez aucun des animaux de ce groupe même pour ceux ayant une progression de la tumeur primaire similaire à celle des témoins (Figure R25).

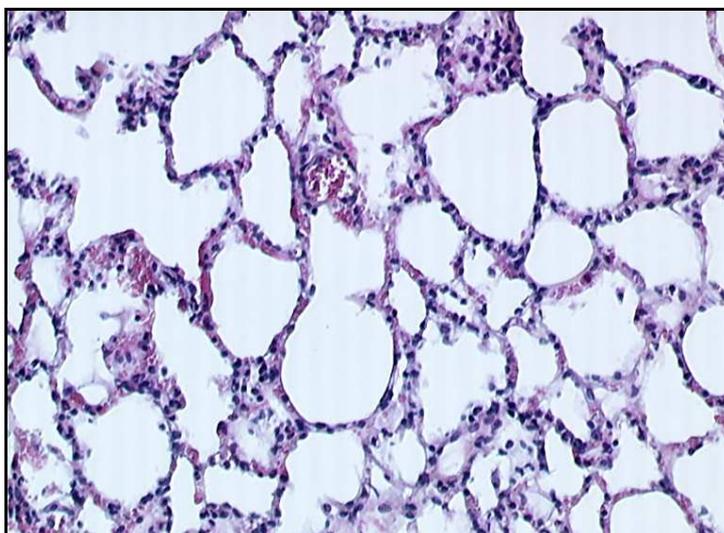


Figure R25 : Coupe de poumon réalisée sur un rat traité par les lipoplexes/pSecEndo
(Grossissement x 100).

Des examens histologiques similaires sont réalisés sur les tumeurs de tous les animaux dans le but d'étudier la densité cellulaire tumorale et de déterminer si l'endostatine induit des changements de structure tissulaire de la tumeur primaire. Les résultats de ces analyses sont présentés sur les Figures R26 et R27.

La structure histologique des tumeurs de ces animaux sacrifiés 58 jours après le début du traitement ne présente pas de différence notable. Les tumeurs des rats témoins comme celles des rats ayant reçu les lipoplexes/pSecEndo sont hétérogènes. Elles ont toutes des régions hyperprolifératives, à forte densité cellulaire où des mitoses sont détectées et des zones de nécrose pouvant renfermer des microcalcifications (Figure R26A et R26B). Les cellules tumorales apparaissent inchangées elles aussi, elles sont de grande taille, avec des noyaux volumineux, irréguliers souvent nucléolés. Dans le centre nécrotique des tumeurs (rats témoins ou rats traités) des couronnes de cellules en prolifération entourent un vaisseau, ces structures sont communément retrouvées dans l'ostéosarcome (Figure R27).

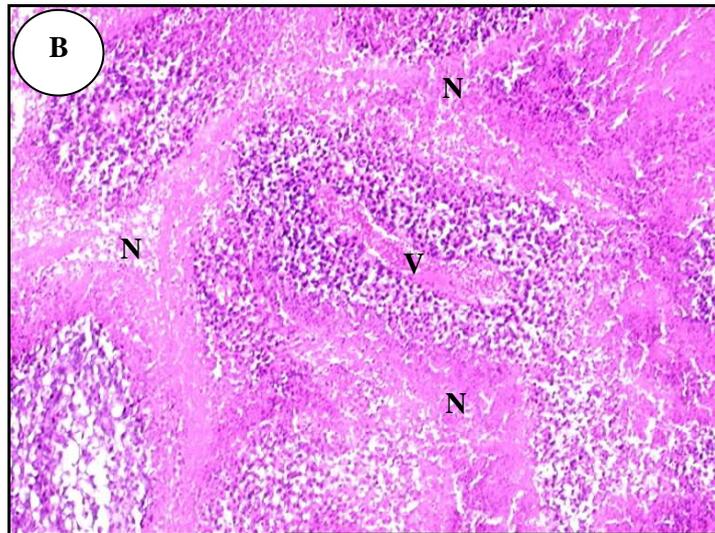
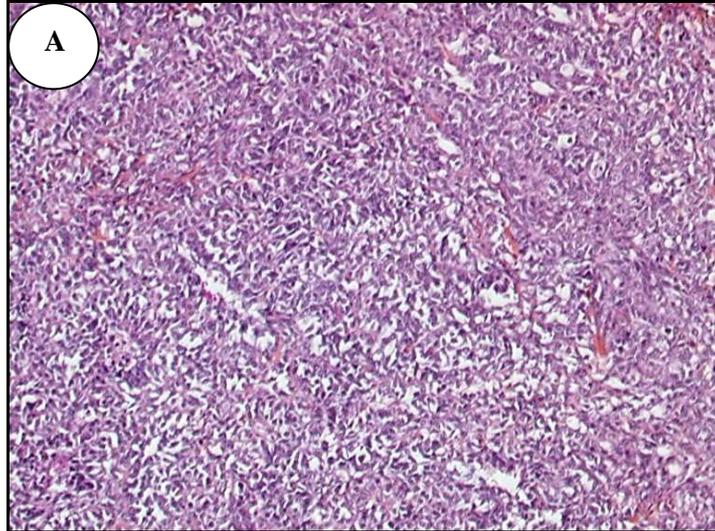


Figure R26 : Coupes histologiques d'une tumeur provenant d'un rat témoin

A : Région hyperproliférative, à densité cellulaire élevée. (Grossissement x 50).

B : Région tumorale centrale. (Grossissement x 50). **N** : nécrose, **V** : vaisseau

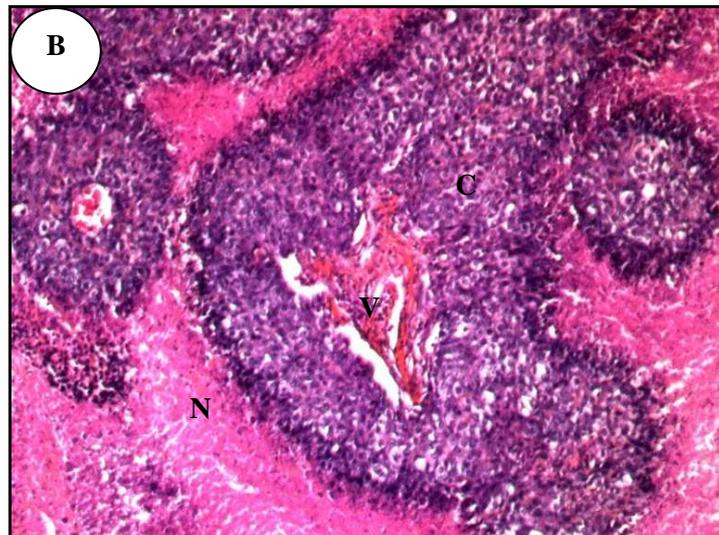
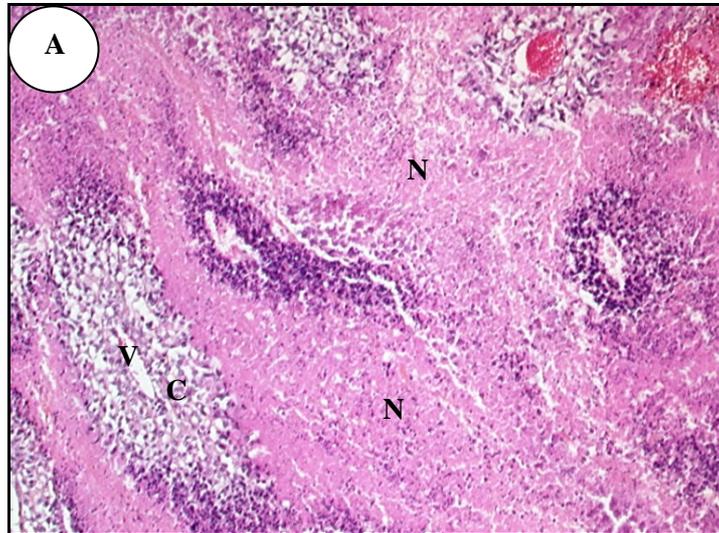


Figure R27 : Coupe histologique d'une tumeur provenant d'un rat traité par les lipoplexes/pSecEndo

A : zone centrale nécrotique. Des zones de nécrose entourent des régions de cellules prolifératives (C) centrées sur des vaisseaux (V) (grossissement x 50).

B : Coupe histologique de la même région observée à un plus fort grossissement (x 100).

Toutefois, l'estimation du pourcentage de nécrose montre une différence entre les animaux des deux lots. La surface nécrosée représente près de 30 % de la tumeur pour les animaux témoins contre 50 à 70 % pour les animaux ayant reçu le gène de l'endostatine.

L'estimation du pourcentage de nécrose est utilisée en oncologie pour apprécier l'efficacité d'un traitement. L'augmentation de ce pourcentage de nécrose des tumeurs traitées est un argument en faveur de l'efficacité de la thérapie génique antiangiogénique. L'efficacité de cette approche est également mise en évidence par les régressions tumorales obtenues pour les deux autres animaux.

Cette expérience montre l'absence d'effets indésirables liés à l'administration répétée de lipoplexes. L'administration intratumorale des lipoplexes peut induire un ralentissement de la croissance de la tumeur mais est surtout efficace pour empêcher toute dissémination métastatique. Ces résultats préliminaires nous permettent de passer à la seconde étape de validation de la thérapie génique antiangiogénique au cours de laquelle les lipoplexes sont administrés par voie intraveineuse aux animaux porteurs de tumeur.

IV – 2. Effets des lipoplexes administrés par voie intraveineuse

IV – 2 – 1. Biodistribution des liposomes cationiques

Il a été montré, dans d'autres modèles tumoraux, que les liposomes cationiques que nous utilisons s'accumulent préférentiellement dans les cellules néoendothéliales des tumeurs (Krasnici *et al.*, 2003).

Afin de déterminer si cette cible tumorale spécifique est conservée lorsque ces liposomes sont administrés par voie intraveineuse dans le modèle d'ostéosarcome greffable de rat, une analyse qualitative de la biodistribution des liposomes dans les tumeurs et les principaux organes : poumons, muscle, foie, rein, cerveau, est effectuée.

Cette analyse est réalisée après injection par voie IV de liposomes couplés à de la rhodamine et de Lectine couplée à la FITC. La lectine couplée à la FITC colore tout le réseau vasculaire, alors que la fluorescence rouge de la rhodamine n'est présente qu'au niveau des cellules ayant incorporé les liposomes cationiques. Une colocalisation de la des fluorescence de la lectine et de la rhodamine indique la présence des liposomes cationiques dans les cellules endothéliales vasculaires.

Une accumulation de la double fluorescence FITC/rhodamine est observée au niveau de la tumeur, alors que le double marquage des muscles environnants est de faible intensité (Figure R28A). Ce double marquage est également rencontré au niveau des vaisseaux localisés dans la région centrale nécrotique de la tumeur (Figure R28B). L'accumulation de la fluorescence due à la rhodamine dans la tumeur n'est pas le résultat d'une densité vasculaire plus importante dans la tumeur puisque le marquage des cellules endothéliales à la Lectine – FITC est aussi intense au niveau du tissu tumoral que musculaire.

Dans les autres organes, la double fluorescence est quasiment absente mettant en évidence une faible accumulation des liposomes au niveau des vaisseaux normaux. Malgré une densité vasculaire importante, on peut noter la quasi absence de double fluorescence au niveau des capillaires des alvéoles pulmonaires (Figure R28C). Une absence de fixation au niveau des capillaires du cerveau est également constatée (Figure R28D).

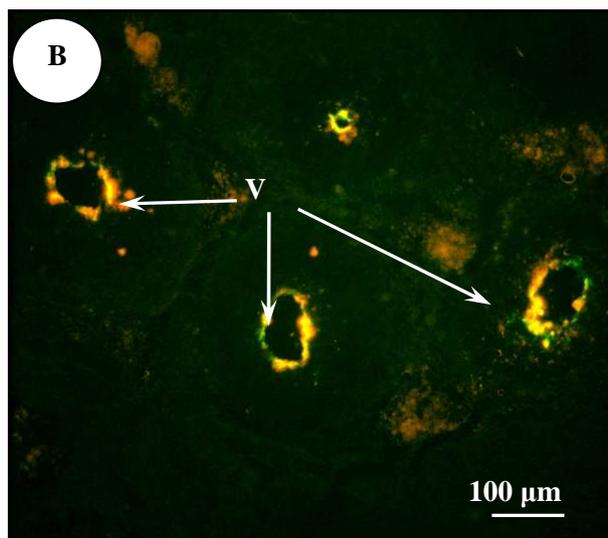
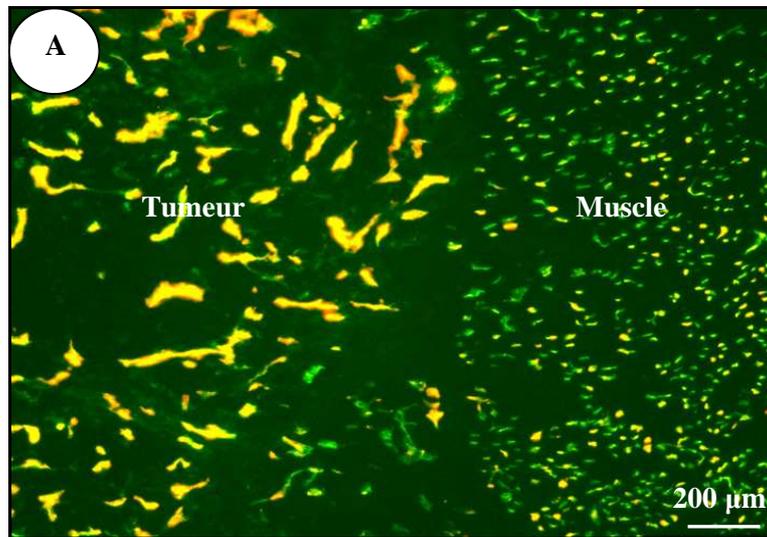


Figure R28 : Biodistribution des liposomes cationiques.

La distribution des liposomes dans les organes et dans la tumeur est étudiée 20 min après leur administration par voie intraveineuse.

A : Interface tumeur /muscle.

B : Région centrale de la tumeur. **V** : vaisseau

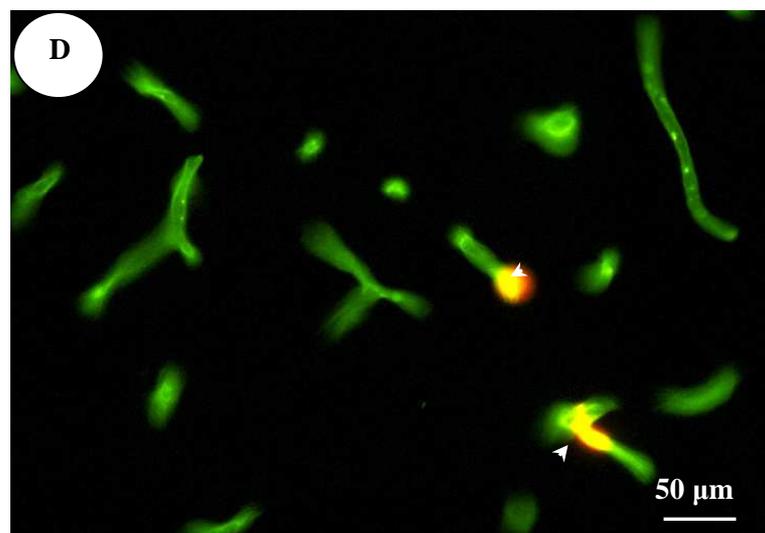
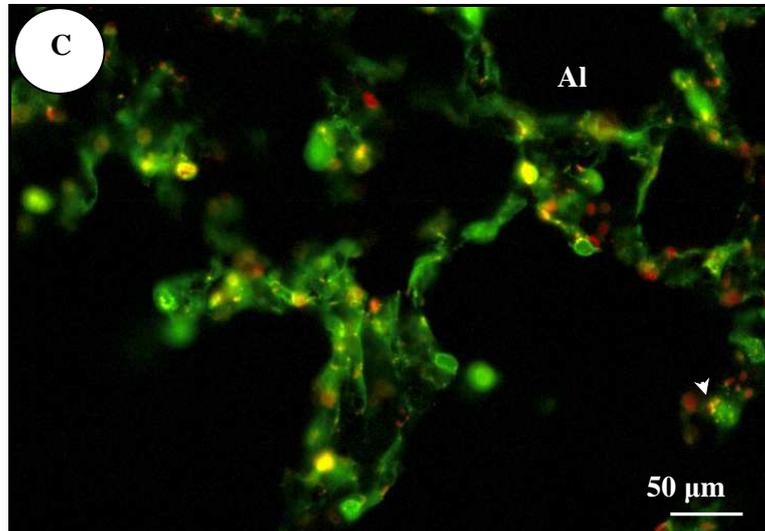


Figure R28 (suite) : Biodistribution des liposomes cationiques.

La distribution dans les principaux organes est étudiée après leur administration par voie intraveineuse. Les flèches signalent la colocalisation des fluorescences traduisant la présence de liposomes dans les cellules endothéliales vasculaires.

C : Poumon.

D : Cerveau.

Al : Alvéole pulmonaire.

Ces résultats indiquent que dans le modèle d'ostéosarcome greffable de rat, les liposomes conservent leur haute affinité pour le réseau vasculaire tumoral périphérique comme central, et s'accumulent peu dans les autres tissus. Ce ciblage du réseau vasculaire tumoral par les liposomes cationiques nous permet d'envisager un protocole thérapeutique dans lequel les lipoplexes seront administrés aux animaux par voie intraveineuse. Les lipoplexes se localiseront de préférence au niveau de la tumeur, la diffusion des agents thérapeutiques dans l'organisme sera limitée.

IV – 2 – 2. Comparaison des effets des ADNc de l'endostatine et de la TnI

Les animaux reçoivent six injections intraveineuses de lipoplexes (volume correspondant à 240 µg d'ADN plasmidique). La capacité des gènes de l'endostatine et de la TnI à ralentir la croissance tumorale est évaluée tout au long du traitement par le calcul du volume tumoral (Carlson *et al.*, 1983). L'effet des gènes antiangiogéniques sur la vascularisation de la tumeur est apprécié au terme de ces six injections par des méthodes immunohistologiques.

IV – 2 – 2 – 1. Effet des gènes antiangiogéniques sur la croissance tumorale

Des différences sont constatées au sein de chaque groupe en ce qui concerne l'évolution du volume tumoral. Sur quatre animaux traités par les lipoplexes/pSecEndo, un présente une régression totale de la tumeur. En revanche, toutes les tumeurs des rats traités à l'aide des lipoplexes/pSecTnITag semblent échapper au traitement. En effet, après dix jours de traitement, le volume tumoral moyen de ce lot est supérieur de 15% par rapport à celui du

lot témoin (Figure R29). Cette analyse montre également que l'endostatine induit un retard de l'évolution tumorale ; à la fin de l'expérience le volume tumoral moyen de ce groupe est inférieur d'environ 25 % par rapport à celui du groupe témoin.

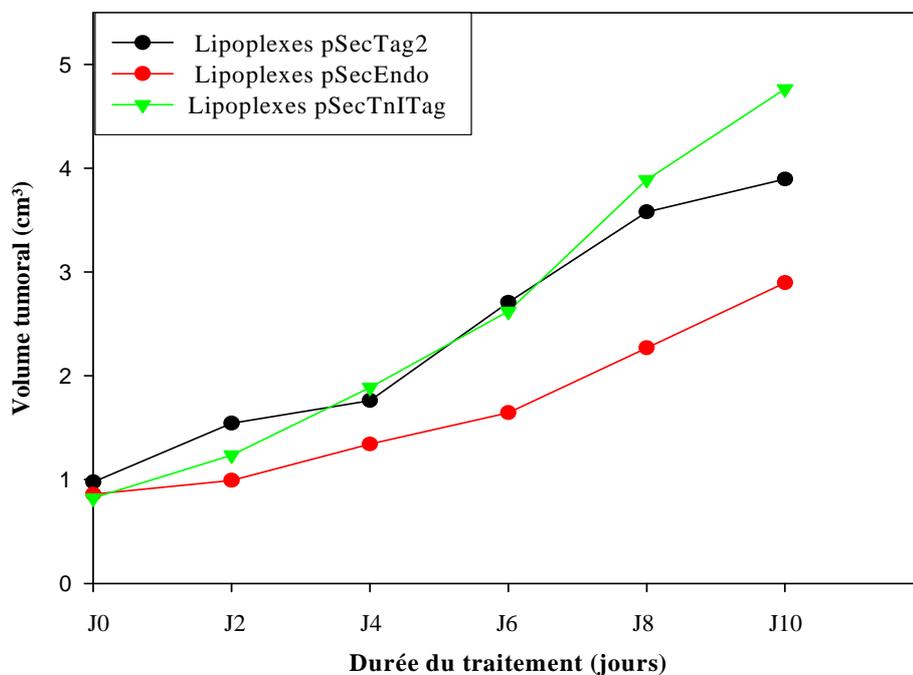


Figure R29 : Evolution des volumes tumoraux moyens en cours de traitement.

Le volume tumoral est calculé par l'application de la formule de Carlsson. Le groupe témoin est composé de 3 rats recevant les lipoplexes/pSecTag2, des lots composés de 4 animaux sont traités respectivement par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnITag.

A la différence de l'endostatine qui ralentit la croissance tumorale, la TnI présente un effet paradoxal *in vivo*, elle s'avère être inefficace à stopper la croissance tumorale, tout au moins dans ce contexte.

IV – 2 – 2 – 2. Effet des gènes antiangiogéniques sur la vascularisation tumorale

Au terme d'une cure de six administrations intraveineuses de lipoplexes, les animaux sont sacrifiés, les tumeurs sont prélevées et soumises à des analyses immunohistologiques. Ces études ont pour but d'évaluer l'effet des gènes de l'endostatine et de la TnI sur la vascularisation tumorale.

L'analyse de la vascularisation tumorale est effectuée sur des fragments prélevés dans différentes régions de la tumeur à l'aide de l'anticorps dirigé contre un marqueur spécifique des cellules endothéliales (RECA-1). Un intérêt plus particulier est accordé à la bordure tumorale, zone de croissance active, normalement la plus vascularisée.

Une différence de la vascularisation périphérique des tumeurs des différents groupes est mise en évidence. Les tumeurs des rats témoins (traités par les lipoplexes/pSecTag2) présentent toutes une vascularisation dense. Leur réseau vasculaire est constitué de vaisseaux irréguliers et nombreux formant des régions de densité vasculaire plus élevée (Figure R30A). Cette organisation vasculaire chaotique est retrouvée dans les tumeurs des animaux ayant reçu les lipoplexes/pSecTnITag (Figure R30B). Les tumeurs de ce lot de rats ont une densité vasculaire importante, similaire à celle des tumeurs du groupe témoin. Une modification très nette du réseau vasculaire tumoral est notée dans le cas des rats traités par les lipoplexes/pSecEndo. Les tumeurs sont moins vascularisées à leur périphérie, les vaisseaux tumoraux sont isolés et de taille plus régulière et plus importante que les vaisseaux des tumeurs témoins (Figure R30C). Les nombreux petits vaisseaux trouvés dans les tumeurs témoins sont absents. La vascularisation périphérique de ces tumeurs est identique à celle retrouvée habituellement au centre d'un ostéosarcome laissé en évolution naturelle ou traité par les lipoplexes/pSecTag2.

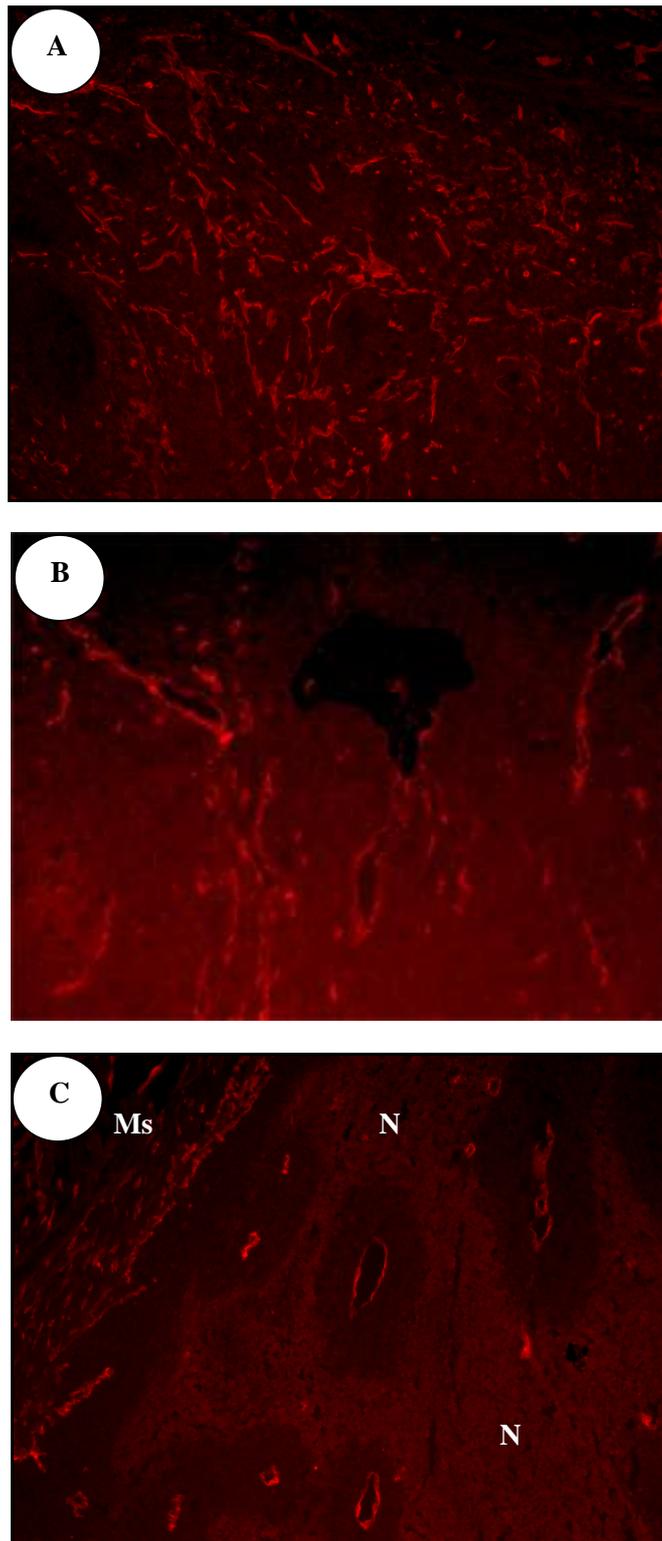


Figure R30 : Analyse de la vascularisation tumorale par microscopie de fluorescence.

La densité vasculaire est analysée qualitativement. Les vaisseaux sont marqués par l'anticorps RECA-1 et l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine. Les photos sont réalisées dans la région périphérique des tumeurs. (Grossissement x 50). (N : Nécrose tumorale, Ms : muscle squelettique).

A : rat témoin ; B : rat traité par les lipoplexes/pSecTnITag ; C : rat traité par les lipoplexes/pSecEndo.

IV – 2 – 2 – 3. Gènes antiangiogéniques et apoptose tumorale

L'apoptose des cellules tumorales et endothéliales est analysée dans les mêmes régions où la densité vasculaire a été étudiée. Elle est mise en évidence par triple immunomarquage. Cette méthode permet de différencier les cellules tumorales apoptotiques qui présentent un double marquage nucléaire DAPI et T.U.N.E.L, des cellules endothéliales apoptotiques, apparaissant marquées par l'anticorps RECA-1 et T.U.N.E.L.

Cette étude confirme la diminution de densité vasculaire observée pour les tumeurs traitées par les lipoplexes/pSecEndo et l'absence de variation de cette densité vasculaire pour les groupes de rats recevant les lipoplexes/pSecTnITag.

IV – 2 – 2 – 3 – 1. Apoptose des cellules tumorales

Dans les tumeurs du lot témoin, peu de cellules tumorales présentant un double marquage T.U.N.E.L. et DAPI, donc apoptotiques, sont détectées. Les quelques cellules apoptotiques visualisées sont dispersées (Figure R31A). Les tumeurs du groupe de rats traité par les lipoplexes/pSecTnITag montrent une légère augmentation des cellules apoptotiques par rapport au lot témoin ; les cellules apoptotiques peuvent être dispersées ou organisées en points focaux (Figure R31B). Une augmentation importante des cellules tumorales apoptotiques est mise en évidence dans les tumeurs traitées par les lipoplexes/pSecEndo. Il est à noter que ces cellules apoptotiques ont une organisation particulière ; elles forment un anneau qui établit une limite entre une zone de nécrose et une couronne de cellules tumorales viables centrées sur un vaisseau (Figure R31C). Cette organisation est typique des régions centrales d'un ostéosarcome laissé en évolution naturelle, elle est également présente dans le centre des tumeurs des animaux témoins ou recevant les lipoplexes/pSecTnITag.

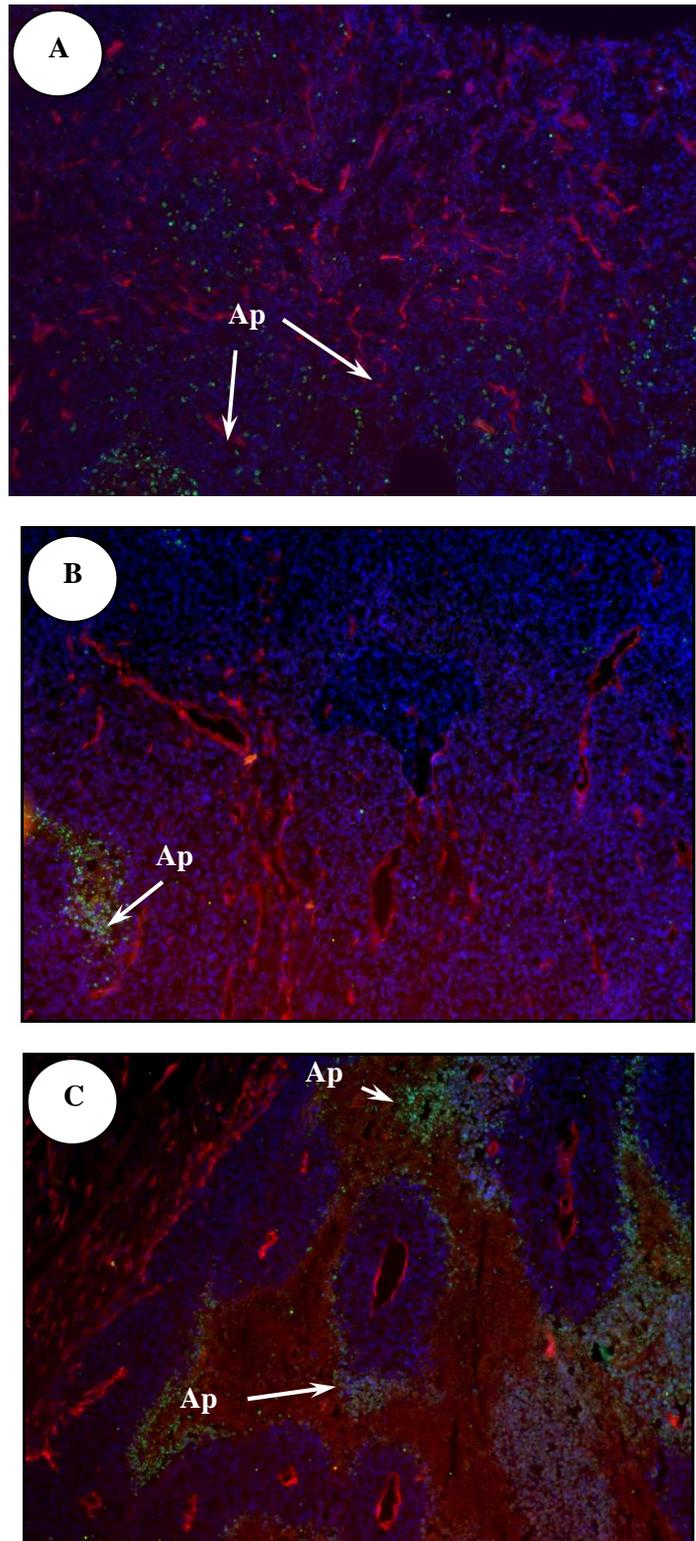


Figure R31 : Détection de l'apoptose des cellules endothéliales et tumorales par microscopie de fluorescence.

Les vaisseaux sont marqués par l'anticorps RECA-1 et l'anticorps secondaire couplé à la fluorescéine, l'apoptose est détectée par la technique T.U.N.E.L.

A : rat témoin. **B** : rat traité par les lipoplexes/pSecTnITag. **C** : rat traité par les lipoplexes/pSecEndo.

Ap : apoptose, **V** : vaisseau. (Grossissement x 50).

IV – 2 – 2 – 3 – 2. Apoptose des cellules endothéliales

Nous n'avons pas mis en évidence dans ces tumeurs la présence de cellules endothéliales marquées par le T.U.N.E.L c'est à dire apoptotiques; ce qui semble indiquer qu'*in vivo* l'endostatine serait plus un inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales qu'un agent pro-apoptotique. L'endostatine empêcherait la mise en place des petits vaisseaux tumoraux, que l'on retrouve dans les tumeurs des animaux témoins ou ayant reçu les lipoplexes/pSecTnITag.

En résumé, au terme d'une cure de six injections intraveineuses de lipoplexes, nous pouvons constater que la TnI est inefficace elle n'entraîne aucun changement histologique dans l'ostéosarcome de rat, alors que l'endostatine induit une diminution de la vascularisation périphérique de la tumeur et une augmentation de l'apoptose des cellules tumorales. De plus, cette étude préliminaire nous permet de montrer l'absence d'effets secondaires liés à l'administration systémique répétée de lipoplexes, aucune perte de poids consécutive à l'administration des lipoplexes n'est notée. Ces résultats nous permettent d'envisager un second essai thérapeutique au cours duquel les lipoplexes/pSecEndo seront administrés par voie intraveineuse et jusqu'à régression de la tumeur ou décès des animaux. Le suivi des animaux est assuré en cours de traitement par l'examen clinique classique et par imagerie médicale.

IV – 3. Effet de l'administration des lipoplexes/pSecEndo par voie intraveineuse

La TnI s'avérant être *in vivo* inefficace pour le traitement de ce modèle tumoral, seuls les lipoplexes/pSecEndo sont utilisés. Au cours du traitement, les animaux sont suivis par tomoscintigraphie au ¹⁸FDG et angioscintigraphie au ^{99m}Tc. En fin d'étude, des analyses

anatomopathologiques nous permettent de confirmer les observations faites par imagerie médicale, et d'étudier la densité cellulaire des tumeurs témoins et traitées par les lipoplexes/pSecEndo.

IV – 3– 1 Evolution tumorale

IV – 3 – 1 - 1 Groupe témoin

Les rats du groupe recevant le traitement témoin (lipoplexes/pSecTag2) présentent tous une évolution tumorale rapide (Figure R35). L'augmentation de la croissance tumorale se traduit en terme d'imagerie par une augmentation de la fixation tumorale du ^{18}F FDG, la tumeur apparaissant plus intensément marquée (Figure R32) :

En début de traitement, la fixation du ^{18}F FDG par la tumeur est faible, elle représente 4% de la fixation totale du ^{18}F FDG. Au cours du temps cette fixation augmente rapidement, atteignant 35% par rapport à la fixation corporelle totale, peu avant le décès de l'animal. Durant le même intervalle, la fixation de ^{18}F FDG au niveau de la patte controlatérale n'ayant pas de tumeur reste stable. Cette forte augmentation de la fixation tumorale du ^{18}F FDG traduit une activité métabolique élevée de la tumeur. Elle est caractéristique d'une tumeur hyperproliférative, d'un ostéosarcome en évolution naturelle. Ces animaux témoins meurent respectivement 27, 39 et 47 jours après le début de la thérapie avec une masse tumorale importante et présentent tous des métastases pulmonaires nombreuses. Certaines sont même détectables macroscopiquement, mesurant de 1,5 à 1,7 cm de diamètre.

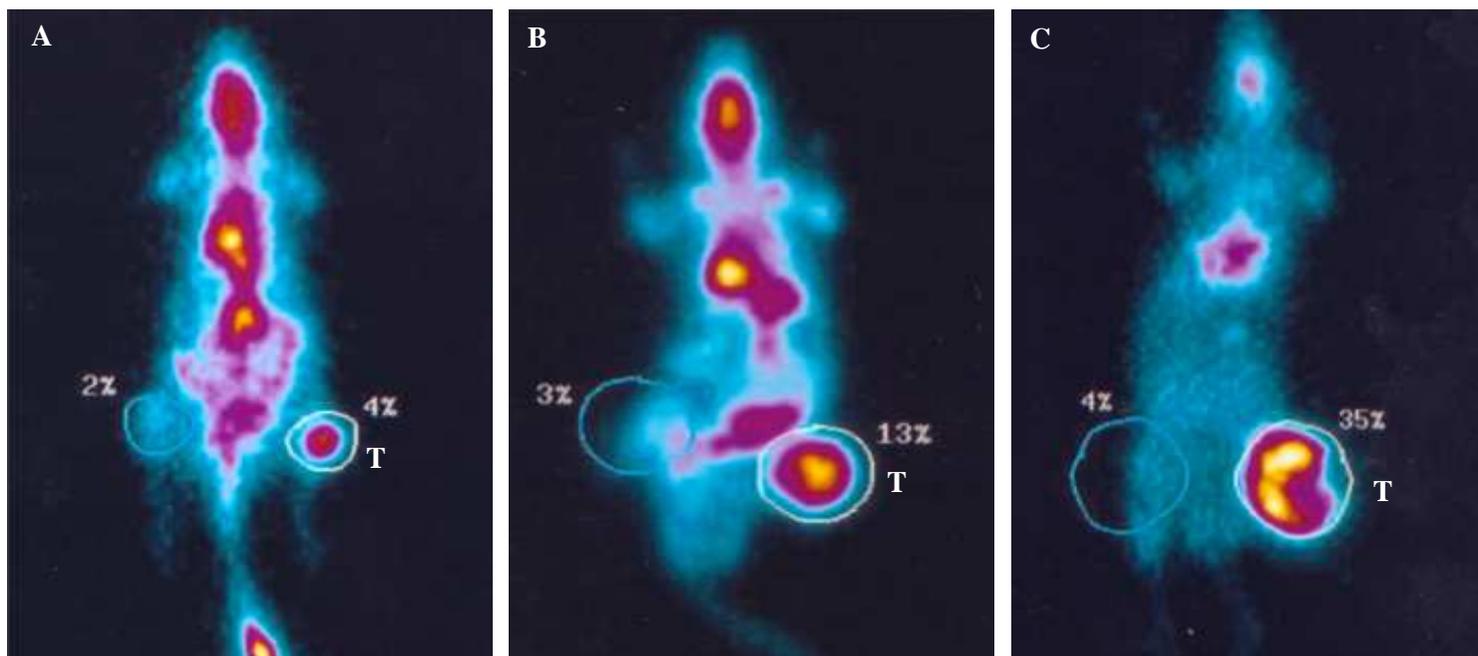


Figure R32 : Evolution de la fixation du ^{18}F FDG au cours du traitement : rat témoin.

Le pourcentage indique la fixation tumorale du ^{18}F FDG par rapport au reste du corps. (T : tumeur)

Ces images sont réalisées au début du traitement (A), après 2 semaines de traitement (B) et après 5 semaines de traitement (C)

IV – 3 – 1 – 2. Groupe Lipoplexe/pSecEndo

Il existe des variations individuelles importantes quand à l'évolution des volumes tumoraux au sein de ce groupe, visibles sur la Figure R35 présentant l'évolution individuelle des tumeurs des rats au cours du traitement.

Trois rats (dénommés lipoplexe/pSecEndo1, lipoplexe/pSecEndo3 et lipoplexe/pSecEndo4, d'après le traitement administré) ont une complète régression tumorale, (Figure R35) ce qui se traduit en terme d'imagerie (aussi bien ^{18}F FDG que $^{99\text{m}}\text{Tc}$) par une diminution de la fixation de radionucléide au niveau de la tumeur qui redevient équivalente à la fixation de la patte controlatérale non porteuse de tumeur (Figure R33). Ces animaux sont traités pendant une semaine supplémentaire afin d'éliminer toute cellule tumorale existante. Ils ne présentent pas de signe de reprise tumorale ni de développement métastatique 3 mois après l'arrêt de la thérapie.

Un rat recevant les lipoplexes/pSecEndo montre un retard de croissance tumoral important (rat Lipoplexe/pSecEndo5, Figure R35). Il meurt 27 jours après le début du traitement d'un arrêt cardiaque au cours d'une injection.

Un animal présente une tumeur qui évolue rapidement, (rat Lipoplexe/pSecEndo6, Figure R35). Il semble que cette tumeur ait échappée à la thérapie, comme l'indiquent la progression de la tumeur et l'évolution de la fixation de ^{18}F FDG et de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ qui toutes deux augmentent rapidement de façon parallèle (Figure R34). Un animal présente, 47 jours après le début du traitement une tumeur qui stagne (rat Lipoplexe/pSecEndo2). Cette tumeur est chirurgicalement excisée, la thérapie est poursuivie car la tumeur récidive. Cent jours après le début de la thérapie, l'administration des complexes est arrêtée pour cause de grossesse. A la mort de cet animal, 35 jours après l'arrêt de la thérapie, l'analyse anatomopathologique révèle la présence de deux métastases pulmonaires, ce qui est peu compte tenu de l'agressivité de l'ostéosarcome et du fait que cet animal est resté un mois sans traitement.

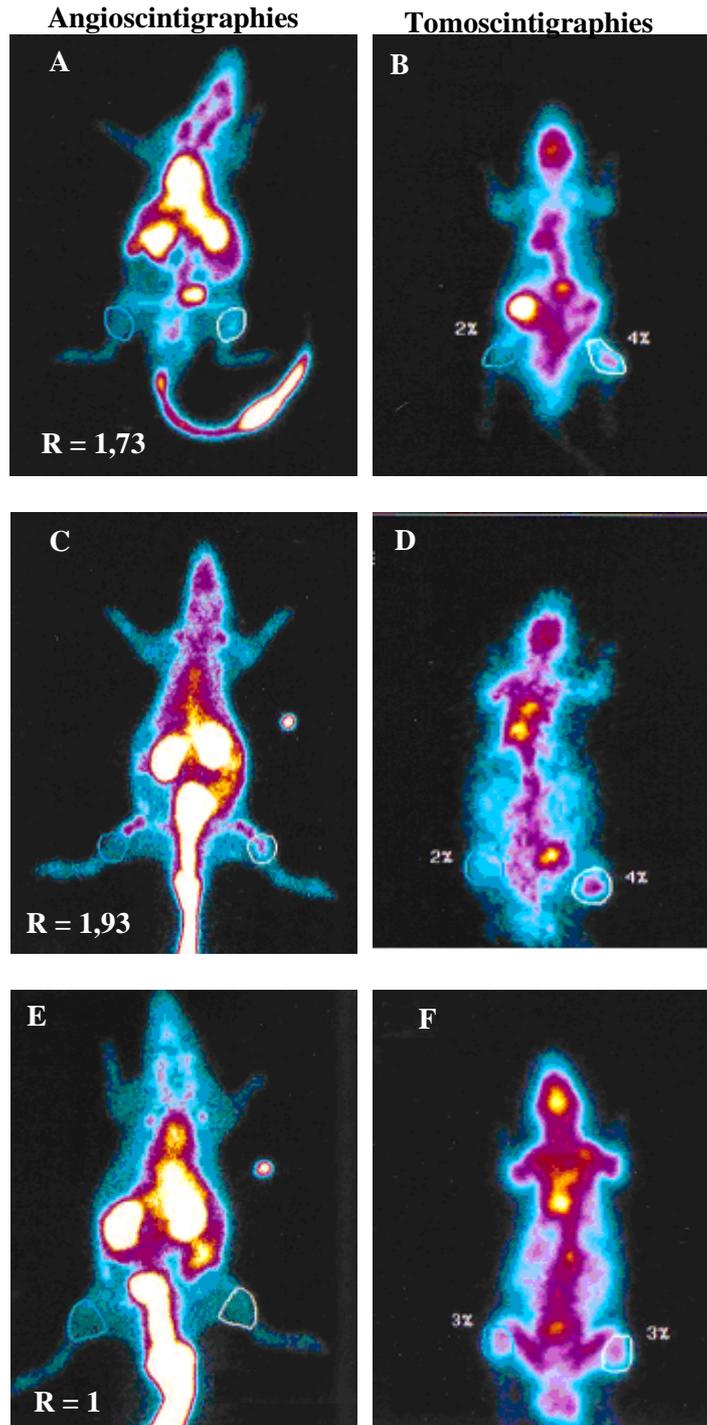


Figure R33 : Evolution parallèle de la fixation tumorale de ^{18}F FDG et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ au cours du traitement lipoplexe/pSecEndo.

Rat pSecEndo3 présentant une involution tumorale. L'angioscintigraphie et la tomoscintigraphie sont réalisées à 48 h d'intervalle. **A, B** : diagnostic de la tumeur. **C, D** : détection de la tumeur après deux semaines de traitement. **E, F** : détection de la tumeur après 4 semaines de traitement. Les pourcentages (**B, D, F**) indiquent la fixation de ^{18}F FDG par la tumeur par rapport au reste du corps ; le rapport R (**A, C, E**) représente la fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de la tumeur comparée à celle de la région controlatérale.

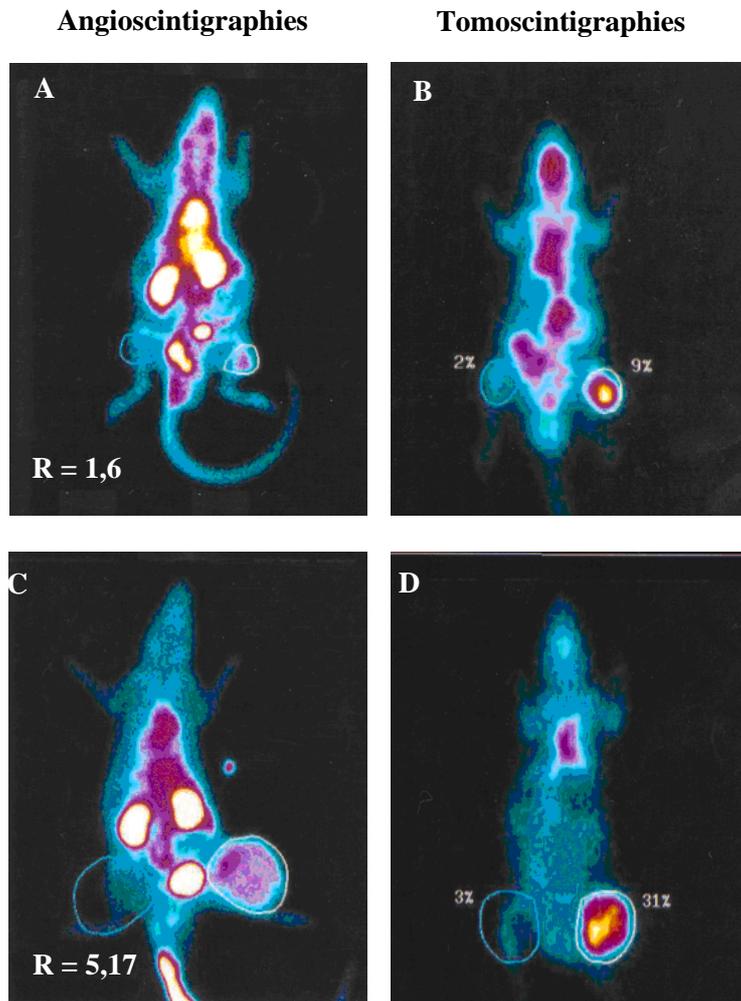


Figure R34 : Fixation de ^{18}F FDG et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ au cours du traitement chez un rat échappant au traitement lipoplexe/pSecEndo.

Rat pSecEndo6

A, B : diagnostic de la tumeur.

C, D : après 3 semaines de traitement

Les pourcentages (**B, D**) indiquent la fixation de ^{18}F FDG par la tumeur par rapport au reste du corps ; le rapport R (**A, C**) représente la fixation de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de la tumeur comparée à celle de la région controlatérale.

La Figure R35 résume l'évolution du volume tumoral de chaque animal inclus dans cet essai.

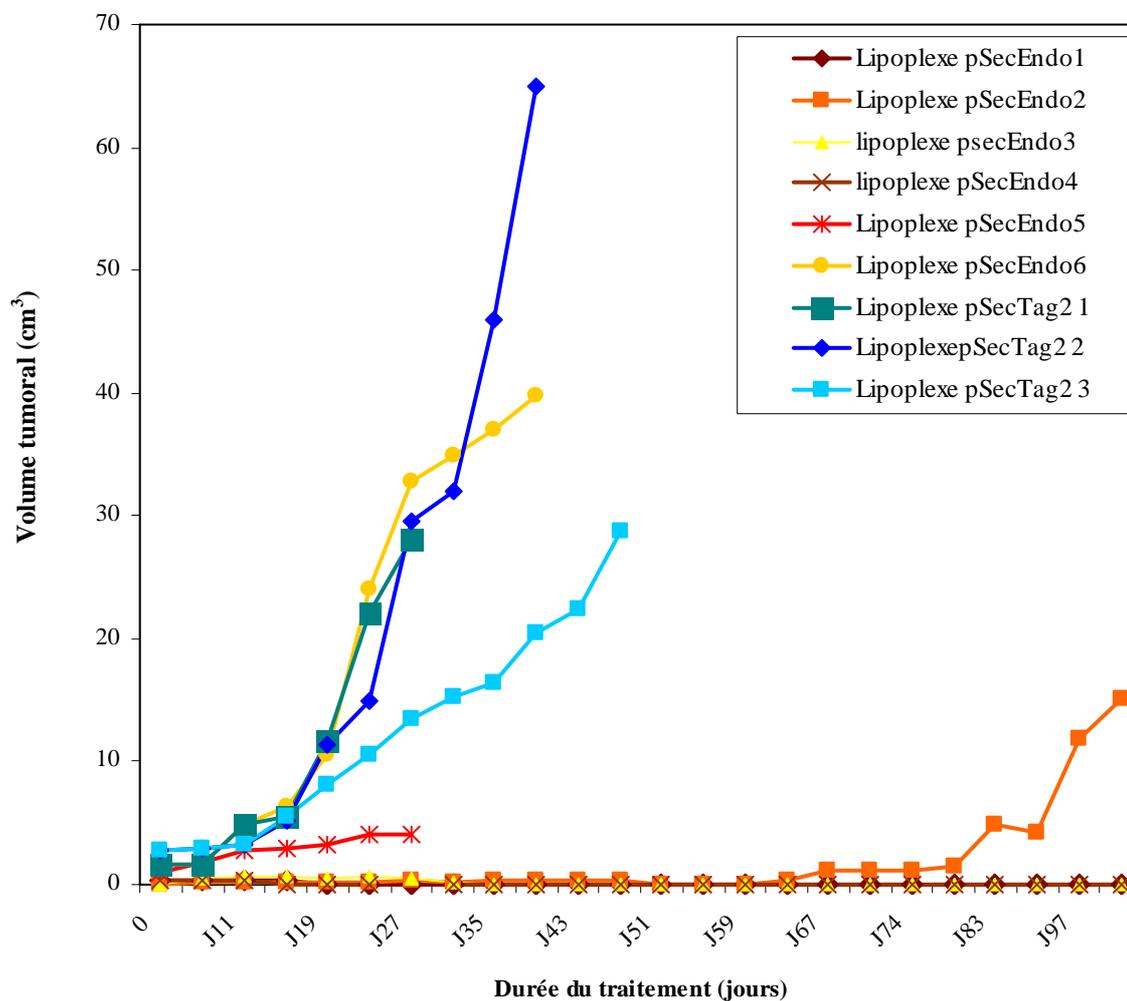


Figure R35 : évolution des volumes tumoraux en cours de traitement.

En résumé :

- les rats témoins sont tous morts dans des délais relativement courts et présentaient à ce moment là des tumeurs ayant un volume important.

Sur les six rats traités par les lipoplexes/pSecEndo :

- Trois présentent une régression totale de la tumeur et aucune récurrence après l'arrêt du traitement
- Un rat présente un retard significatif de la croissance tumorale.
- Un autre rat a une tumeur évoluant lentement qui est réséquée et récidive mais l'animal présente une survie prolongée par rapport aux animaux témoins.
- Pour un animal la tumeur semble échapper au traitement.

Ces évolutions des volumes tumoraux sont constatées en tomoscintigraphie au ^{18}F FDG aussi bien qu'à l'aide de l'angioscintigraphie $^{99\text{m}}\text{Tc}$.

Les examens par imagerie médicale (tomoscintigraphie au ^{18}F FDG et angioscintigraphie $^{99\text{m}}\text{Tc}$) permettent de déterminer la prise de la greffe tumorale, de suivre l'évolution de la masse tumorale et de sa vascularisation au cours du temps.

Comme présentés sur les Figures R33 et R34, les niveaux de fixation tumoraux des radionucléides, pour un même animal, évoluent en parallèle, mettant en évidence l'existence d'une relation entre le degré de vascularisation de l'ostéosarcome et son métabolisme.

L'augmentation de la croissance tumorale se traduit en terme d'imagerie par une augmentation de la fixation du radionucléide (^{18}F FDG ou $^{99\text{m}}\text{Tc}$), la tumeur apparaissant plus intensément marquée. Cette augmentation de la fixation des radionucléides reflète l'augmentation du métabolisme tumoral (cas du ^{18}F FDG), une vascularisation tumorale accrue ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) et se traduit par un accroissement de la taille de la tumeur (Figure R34). Au contraire une diminution de marquage radioactif au niveau de la tumeur indique une involution du processus tumoral : métabolisme réduit et diminution de la vascularisation (Figure R33). Dans le cas de l'angioscintigraphie, un retour du rapport de fixation R à une valeur de 1 indique que la tumeur a une vascularisation identique à celle de la patte controlatérale. Au début du traitement ce rapport est voisin de 1,7 – 2. La tumeur est alors faiblement

vascularisée, un accroissement de ce rapport indique, tout comme une augmentation de la fixation de ^{18}F FDG, une croissance tumorale accrue.

IV – 3 –2. Analyses histologiques des tumeurs et des poumons en fin de traitement par les lipoplexes/pSecEndo

Des études anatomopathologiques sont réalisées en fin d'essai sur des coupes des tumeurs et des poumons. Elles permettent de confirmer les résultats observés en imagerie médicale au cours de la thérapie.

Les poumons des animaux ayant reçu les lipoplexes/pSecEndo sont soumis à des examens anatomopathologiques pour déceler la présence éventuelle de métastases. Aucun foyer métastatique ne peut être détecté microscopiquement dans les poumons de ces animaux, même chez le rat dont la tumeur primaire semblait échapper au traitement (Figure R36A).

Au contraire, les poumons des rats témoins ont de nombreuses métastases pulmonaires, certaines sont même détectables macroscopiquement, dont une métastase d'un diamètre de 1 cm. L'étude histologique de ces métastases montre une grande similitude avec la tumeur primaire. Ces foyers tumoraux secondaires ont une densité cellulaire élevée et des zones de nécrose peuvent être détectées au centre des plus importantes métastases (Figure R36B).

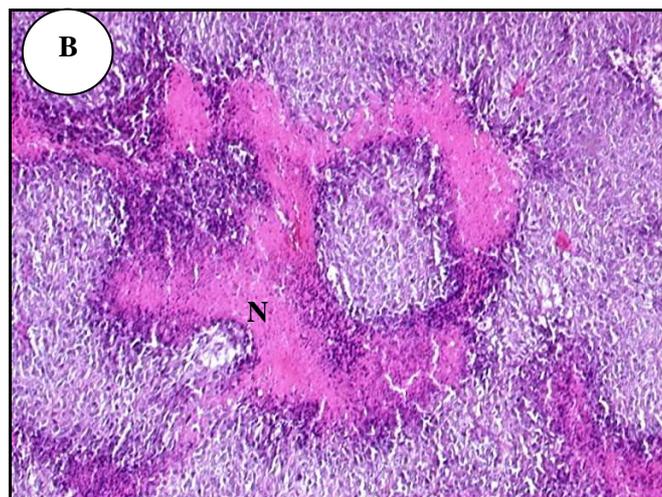
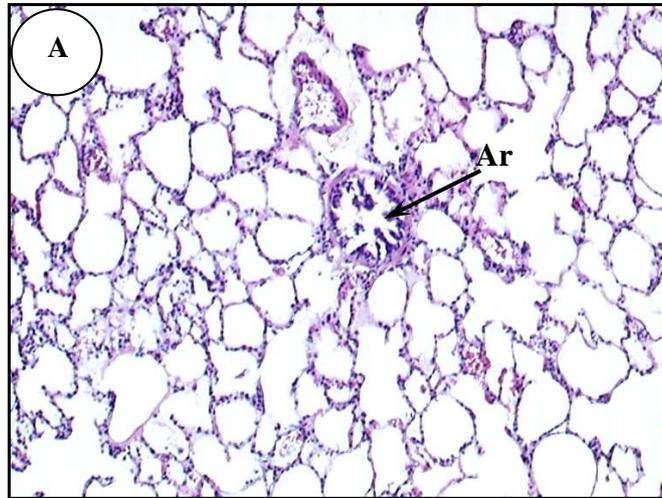


Figure R36 : Analyses histologiques des poumons en fin de traitement par les lipoplexes contrôles et pSecEndo.

A : Coupe de tissu pulmonaire de rat recevant les lipoplexes/pSecEndo. (**Ar** : artériole) (Grossissement x 50).

B : Coupe de tissu pulmonaire de rat témoin. Région nécrotique au centre de la métastase. (**N** : Nécrose) (Grossissement x 50).

Des examens identiques réalisés sur les tumeurs primaires, ne montrent pas de différences histologiques entre les tumeurs du groupe témoin et celles du groupe recevant les lipoplexes/pSecEndo. Les tumeurs présentent toutes l'organisation tissulaire typique de l'ostéosarcome caractérisée par la présence de régions hyperprolifératives à densité cellulaire et mitoses élevées en périphérie, et de régions plus ou moins nécrotiques au centre de la tumeur. Dans ces régions nécrotiques, des microcalcifications peuvent être présentes (Figure R37).

L'appréciation du pourcentage de nécrose tumorale comme indicateur de l'efficacité du traitement s'avère ici inutilisable, car aucune augmentation significative de la nécrose tumorale n'est observée après l'administration des lipoplexes/pSecEndo. On peut toutefois noter que toutes les tumeurs témoins envahissent le tissu musculaire voisin. Ce phénomène n'est pas observé pour les tumeurs des animaux traités par l'endostatine. L'endostatine semble prévenir ce processus.

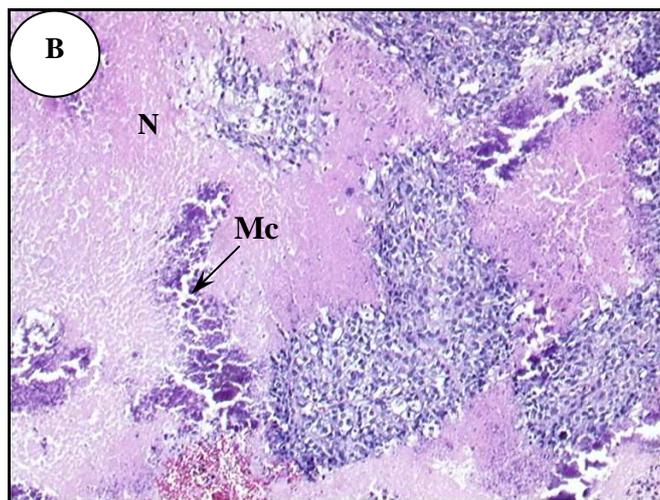
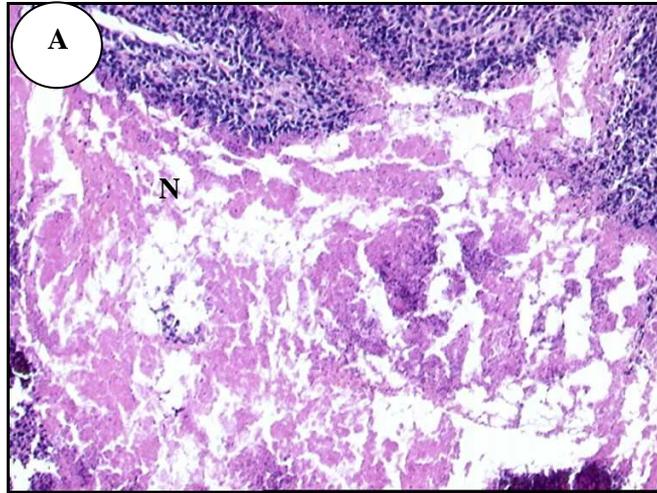


Figure R37 : Analyses histologiques des tumeurs en fin de traitement par les lipoplexes contrôle et pSecEndo.

A : Coupe de tissu tumoral de rat témoin (grossissement x 50).

B : Coupe de tissu tumoral de rat recevant les lipoplexes/pSecEndo (grossissement x 50).

N : Nécrose, **Mc :** Microcalcification

IV – 3 –3. Dosage de l'endostatine circulante

Un dosage de l'endostatine plasmatique est réalisé afin de déterminer si le ralentissement de la croissance tumorale, la diminution de la vascularisation de la tumeur et la prévention de la dissémination métastatique peuvent être dues à une augmentation du taux d'endostatine circulante.

L'endostatine est dosée dans le plasma de quatre rats recevant les lipoplexes/pSecEndo et des 3 rats témoins, 24 et 48 h après l'administration des lipoplexes par voie intraveineuse. Les résultats de ce dosage sont présentés sur la Figure R38.

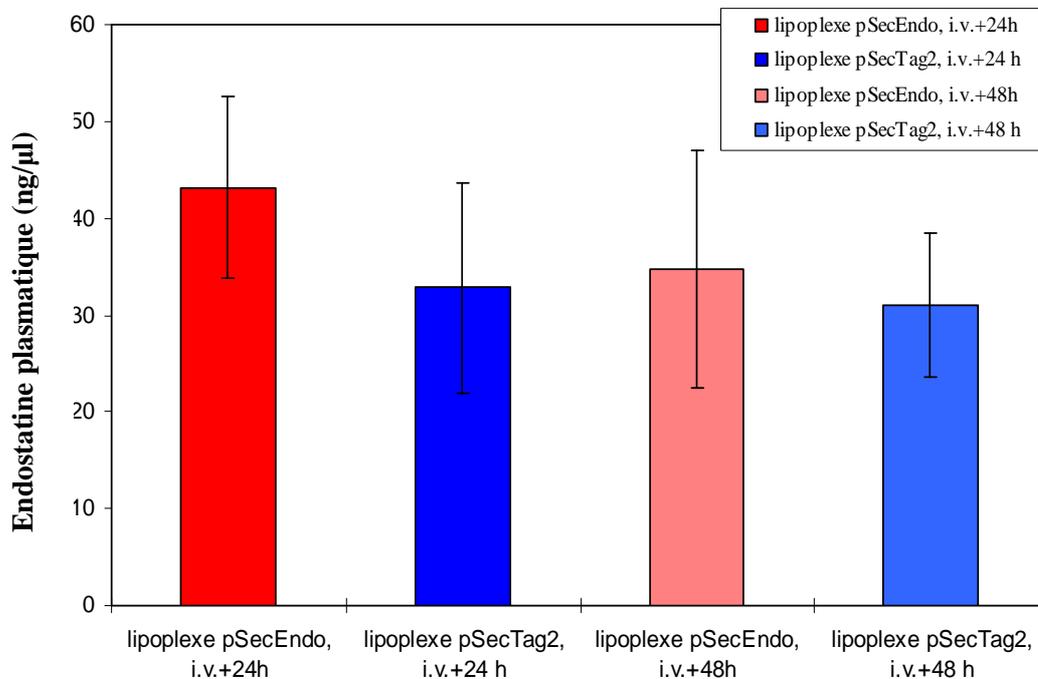


Figure R38 : Dosage E.I.A de l'endostatine plasmatique.

Ce dosage est réalisé 24 et 48 h après injection intraveineuse des lipoplexes/pSecEndo et pSecTag2

Iv : administration par voie intraveineuse.

Le dosage de l'endostatine plasmatique 24 h après l'administration des lipoplexes, met en évidence une concentration de cette protéine légèrement supérieure pour le lot recevant les lipoplexes/pSecEndo par rapport au groupe témoin : les concentrations sont respectivement de 43 et 32 ng d'endostatine/ μl ; cette différence n'est toutefois pas significative ($p > 0,05$). Une diminution de 8 ng/ μl du taux d'endostatine circulante est mesurée entre les temps iv + 24 h et iv + 48 h chez les animaux recevant les lipoplexes/pSecEndo. Cette diminution indique que l'administration des lipoplexes augmenterait très légèrement la concentration circulante de cette protéine. Les variations de la concentration d'endostatine circulante mesurée ne sont pas significatives ($p > 0,05$). Ce résultat est nettement en faveur du ciblage de la vascularisation tumorale par les liposomes cationiques, il confirme ceux obtenus avec les liposomes marqués à la rhodamine et l'hypothèse d'une action locale tumorale de l'endostatine.

A l'issue des expériences réalisées sur le modèle animal, certaines conclusions concernant les gènes employés apparaissent.

- la TnI est inefficace à induire un retard croissance ou une diminution vascularisation tumorale *in vivo* dans le modèle tumoral que nous utilisons.

- l'administration de la séquence codante de l'endostatine entraîne une diminution importante de vascularisation tumorale, un retard de croissance tumorale mais surtout prévient la dissémination métastatique de l'ostéosarcome.

- que le traitement soit administré par voie intratumorale ou intraveineuse, un allongement de survie est constaté pour tous les animaux recevant les lipoplexes/pSecEndo.

Les analyses statistiques réalisées pour calculer les courbes de survie des rats ayant reçu le traitement par voie intraveineuse montrent un allongement de survie significatif : Dans cette analyse, l'animal décédé à j27 n'est pas pris en compte, attendu qu'il n'est pas mort des suites de la progression tumorale mais d'un choc consécutif à l'injection des lipoplexes.

$p < 0,05$ (test de Mann et Whitney) (Figure R39).

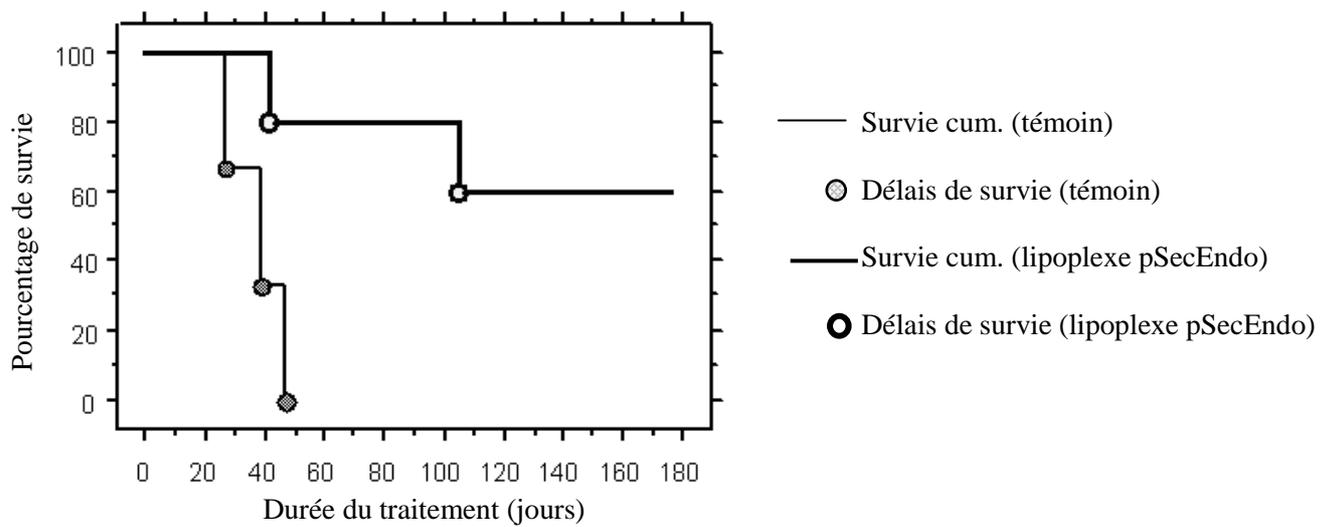


Figure R39 : Analyse de la survie des animaux traités par voie intraveineuse.

L'analyse statistique de la survie est réalisée en appliquant un test de Kaplan Meyer.

La survie des rats traités par les lipoplexes/pSecEndo est évaluée contre celle des rats traités par les lipoplexes/pSecTag2. Le traitement débute à j0. $p = 0,042$

L'allongement de survie des rats traités par les lipoplexes/pSecEndo met en évidence la validité et l'efficacité de la thérapie génique à vecteur non viral dans le traitement de ce modèle d'ostéosarcome.

Les résultats obtenus nous permettent d'envisager la poursuite de cette étude, en incluant un nombre plus important de rats dans les essais.

DISCUSSION

Le travail que nous présentons entre dans le cadre du développement des nouvelles approches thérapeutiques anticancéreuses. L'objectif à terme serait de mettre au point une stratégie de thérapie génique antiangiogénique adjuvante ou néoadjuvante des tumeurs solides.

Nous avons examiné l'action antiangiogénique de deux gènes : l'endostatine et l'isoforme musculaire de la troponine I (TnI). Cette étude est menée *in vitro* sur des lignées cellulaires en culture et *in vivo* sur un modèle expérimental d'ostéosarcome de rat greffé en position orthotopique et connu pour être proche de la situation pathologique humaine.

Dans un premier temps nous rappellerons le fait majeur issu de l'expérimentation *in vitro* : la confirmation de l'activité antiangiogénique spécifique des gènes utilisés sur des modèles cellulaires mimant le modèle expérimental animal. Nous exposerons ensuite les raisons du choix du modèle animal et de la stratégie thérapeutique employée, enfin nous discuterons les principaux résultats tirés de ces expériences *in vivo* :

- la TnI appliquée *in vivo*, se révèle inefficace à induire un retard de la croissance tumorale et la prévention du développement des néovaisseaux tumoraux
- l'endostatine *in vivo* s'oppose à la dissémination métastatique
- l'endostatine induit une diminution de la vascularisation tumorale
- les liposomes cationiques administrés par voie intraveineuse permettent un ciblage tumoral des ADNc
- les techniques d'imagerie médicale sont utiles et applicables dans le suivi de la thérapie génique antiangiogénique

I. Effet des gènes utilisés *in vitro* sur des modèles de culture cellulaire

Le but de l'expérimentation réalisée *in vitro* a été de valider la méthode de transfert des gènes sous forme complexée à des liposomes cationiques également utilisée *in vivo*, de confirmer et comparer l'action antiangiogénique des gènes étudiés. Le choix des lignées cellulaires et du mode de transfection ont été réalisés dans la perspective d'application de la stratégie thérapeutique sur un modèle animal expérimental.

Afin de pouvoir comparer leur action antiangiogénique, chacun des deux gènes a été inséré dans le même vecteur d'expression plasmidique pSecTag2 qui possède une séquence permettant la sécrétion de la protéine codée par le plasmide recombinant. Une telle séquence permet d'amplifier l'efficacité de la transfection ; la protéine recombinante synthétisée par une cellule transfectée peut gagner une autre cellule cible non transfectée, et y exercer son action. La sécrétion des protéines recombinantes est confirmée par des techniques d'immunohistochimie montrant la présence des protéines endostatine et TnITag dans les cellules transfectées, et dans le milieu environnant. Les expériences de coculture verticale réalisées à l'aide de cellules d'ostéosarcome électroporées par les constructions pSecEndo et pSecTnITag et de cellules endothéliales capillaires confirment la sécrétion des protéines d'intérêt et mettent en évidence le potentiel antiangiogénique des gènes étudiés. En effet, l'exposition des cellules endothéliales aux clones cellulaires d'ostéosarcome sécrétant les protéines angiostatiques se traduit par un ralentissement significatif de la prolifération cellulaire. Ceci témoigne d'un taux de sécrétion, par les cellules transfectées, suffisant pour induire un effet inhibiteur de croissance des cellules endothéliales et de l'intégrité des protéines SecEndo et SecTnITag.

Les résultats obtenus au cours des expériences de transfert de gènes, par les lipoplexes sur les lignées cellulaires étudiées ont permis de mettre en évidence plusieurs points. Ces études confirment la spécificité de l'activité antiangiogénique de l'endostatine, démontrée pour la première fois par Boehm (1997), et de la TnI (Moses *et al.*, 1999 ; Feldman *et al.*, 2002). La TnI tout comme l'endostatine est un inhibiteur spécifique de la prolifération des cellules endothéliales qu'elles soient d'origine humaine (cellules HUVEC) ou bovine (cellules EHG). Ces données montrent que *in vitro* la TnI est un inhibiteur de l'angiogenèse aussi spécifique et au moins aussi efficace que l'endostatine, provoquant, à concentration égale, une inhibition de la prolifération des cellules EHG plus importante que celle générée par l'endostatine.

Le fait que la TnI comme l'endostatine, inhibe seulement la prolifération cellulaire stimulée par des mitogènes (b-FGF et VEGF) est mis en évidence par Moses et son équipe (Moses *et al.*, 1999) puis par Feldman (Feldman *et al.*, 2002). Ces données pourraient indiquer que la TnI est un agent antagoniste de ces facteurs de croissance et inhiberait la croissance des cellules endothéliales en entrant en compétition avec ces agents pro-angiogéniques au niveau de leur récepteurs membranaires (Moses *et al.*, 1999). De plus, cette hypothèse rejoint un des mécanismes d'action proposés pour l'endostatine (Sasaki *et al.*, 1999). Pour notre part, les résultats sont similaires puisque nous montrons que la TnI et l'endostatine sont *in vitro* des inducteurs de l'apoptose des cellules endothéliales. Ceci nous permet de supposer qu'appliquées au traitement de l'ostéosarcome greffable de rat, la TnI et l'endostatine vont toutes les deux exercer un puissant effet inhibiteur de l'angiogenèse, peut être selon le même mécanisme d'action : par induction de l'apoptose des cellules endothéliales.

Après avoir vérifié que les gènes d'intérêt sont *in vitro* des inhibiteurs spécifiques de la prolifération des cellules endothéliales, nous avons évalué leur effet antiangiogénique sur un modèle orthotopique d'ostéosarome, greffé en position paratibiale chez des rats immunocompétents.

Cet ostéosarcome greffable est issu d'une tumeur primitive induite par l'injection d'une solution colloïdale d'hydroxyde de ¹⁴⁴Cérium (Allouche *et al.*, 1980 ; Jasmin *et al.*, 1982). Le modèle choisi reproduit les caractéristiques métaboliques, agressives, histologiques et métastatiques de l'ostéosarcome humain (Jasmin *et al.*, 1982 ; Hernigou *et al.*, 1987 ; Takeshita *et al.*, 1996).

Les protocoles expérimentaux que nous appliquons se rapprochent de la réalité clinique puisque le traitement est appliqué sur des tumeurs décelables et évolutives et que les animaux sont immunocompétents, la réponse observée est donc proche de la réalité clinique. Notre modèle se distingue sur ces points d'autres études de thérapie génique dans lesquelles l'induction de la maladie et le traitement sont simultanés. De telles études utilisent souvent des cellules tumorales modifiées pour exprimer le gène d'intérêt (Ye *et al.*, 2002 ; Shi *et al.*, 2002). De plus, beaucoup d'études ont été réalisées sur des animaux présentant une défaillance du système immunitaire (Shi *et al.*, 2002 ; Pukkanen *et al.*, 2002) ce qui favorise la greffe de cellules tumorales. Cependant la réponse observée est modifiée par l'immunodéficiences.

II. Pourquoi l'ADNc de TnI n'entraîne *in vivo* ni retard de la croissance tumorale ni modification de la vascularisation ?

Les données obtenues après une cure de six administrations intraveineuses des lipoplexes/pSecTnITag aux rats porteurs d'ostéosarcome sont inattendus et très différents de ceux obtenus *in vitro* sur des cultures cellulaires. En effet les expériences de culture cellulaire et les résultats de Moses (1999) nous laissaient supposer que la TnI se révélerait *in vivo* un inhibiteur de l'angiogenèse au moins aussi efficace que l'endostatine.

Sur le modèle d'ostéosarcome de rat, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'activité antiangiogénique de la TnI. En effet, aucun ralentissement de la croissance tumorale n'est observé pas plus qu'une diminution de la densité vasculaire tumorale en réponse au traitement par l'ADNc de la TnI. Ces observations sont en contradiction avec les résultats de Moses (1999), qui avait mis en évidence pour la première fois l'action antiangiogénique *in vivo* de la TnI ainsi que sa capacité à prévenir le développement de métastases pulmonaires dans un modèle de mélanome murin.

L'absence d'efficacité thérapeutique ne peut être imputée au vecteur plasmidique puisque le même est utilisé dans le cas de l'endostatine et une activité antiangiogénique de la protéine *in vivo* est clairement mise en évidence. Nous ne pouvons pas non plus incriminer les liposomes dont nous avons montré le ciblage tumoral spécifique. Les résultats observés sont attribuables à la TnI elle-même. Nous proposons quelques hypothèses pour expliquer cette absence d'effet.

La protéine codée par le plasmide présente un changement d'acide aminé (une thréonine remplace une isoleuine) par rapport à la séquence décrite par Zhu (Zhu *et al.*, 1994). Ce changement de base constaté peut être dû à une erreur survenue lors du séquençage ou il peut s'agir d'une mutation sur le plasmide, mais ce changement n'affecte apparemment pas

l'activité de la protéine *in vitro*. Cette modification ne peut à elle seule expliquer l'absence d'efficacité de la TnI *in vivo*. Des expériences complémentaires nous permettront de déterminer la nature de ce changement.

La TnI recombinante exprimée à partir de notre construction plasmidique est fusionnée à un épitope c-Myc. La présence de cet épitope pourrait faire adopter *in vivo* une structure tridimensionnelle à la protéine qui la rend inactive. L'existence d'une relation entre la conformation d'une protéine et son activité antiangiogénique a été mise en évidence pour l'endostatine (Boehm, 1999). Nous pouvons supposer qu'une telle relation existe aussi dans le cas d'autres protéines antiangiogéniques endogènes dont la TnI.

D'autre part, peu d'attention a été portée sur cette isoforme de la TnI depuis les travaux de Moses. Seule la TnI cardiaque est étudiée de part son implication en temps que marqueur des atteintes cardio-vasculaires. L'homologie importante existant entre les isoformes musculaire et cardiaque de cette protéine permet de supposer que la TnI musculaire se comporte dans la circulation sanguine de manière identique à la TnI cardiaque. Giuliani a montré que les formes libres de la TnI cardiaque sont minoritaires et que la troponine I circulante est majoritairement sous forme de complexe binaire [I-T] ou ternaire [I-C-T] (Giuliani *et al.*, 1999). L'implication de la TnI musculaire dans ces complexes aurait certainement pour conséquence de la rendre inactive.

Le mécanisme suivant lequel la TnI musculaire exercerait son activité antiangiogénique reste inconnu, ainsi que l'étape de l'angiogénèse qu'elle pourrait cibler. Tous les inhibiteurs de l'angiogénèse n'exercent pas leur action au même stade de ce processus. Bergers a montré que l'endostatine a un spectre d'action assez étendu et cible à la fois les étapes précoces et un peu plus tardives de l'angiogénèse (Bergers *et al.*, 1999). La TnI pourrait exercer son action antiangiogénique aux stades précoces de l'angiogénèse. Dans le

modèle décrit par Moses, la TnI est administrée 24 h après l'inoculation des cellules tumorales. Le fait qu'une action antiangiogénique de la TnI soit alors observée pourrait indiquer que cette protéine inhibe une étape précoce de l'angiogenèse, étape qui est dépassée lorsque nous débutons l'application du traitement.

Des essais complémentaires sont programmés afin de confirmer les résultats obtenus *in vivo*. Un clonage de l'ADNc de la protéine sans fusion à un élément de détection (épitope c-Myc) peut permettre de déterminer si la fusion de la TnI à l'épitope c-Myc est responsable des résultats obtenus. La TnI est certes inefficace appliquée au traitement de l'ostéosarcome, mais elle pourrait se révéler un bon agent thérapeutique pour inhiber la vascularisation d'autres tumeurs. Une spécificité d'action tissulaire est constatée pour certains inhibiteurs (Dkhissi *et al.*, 2003). Il se pourrait que ce soit le cas de la TnI. Une comparaison de l'effet de la TnI dans d'autres modèles tumoraux permettrait de confirmer l'inefficacité de la TnI *in vivo* ou d'obtenir une indication concernant la possible action tissu-spécifique de cet agent.

Nous pouvons noter que depuis les travaux de Moses, aucun travail relatif à l'action antiangiogénique *in vivo* de la TnI n'a été publié.

III. L'ADNc de l'endostatine prévient la dissémination métastatique et entraîne un retard de croissance tumorale *in vivo*

Outre un ralentissement, voire dans certains cas une inhibition totale, du développement tumoral, le résultat essentiel obtenu lors de ces essais employant l'ADNc de l'endostatine comme agent antiangiogène, est la prévention de la dissémination métastatique. Ce phénomène est uniquement observé pour les animaux qui ont reçu les

lipoplexes/pSecEndo, et ce indépendamment de la voie d'administration. Au contraire, de nombreuses métastases pulmonaires sont détectées macroscopiquement et microscopiquement chez tous les rats témoins.

Cette protection contre la dissémination métastatique pourrait s'expliquer par la différence de volume tumoral existant entre les rats traités et témoins. Cependant, il faut noter que tous les rats recevant les lipoplexes/pSecEndo ne présentent pas de régression ou de ralentissement de la croissance tumorale. Certains animaux semblent échapper au traitement et présentent des tumeurs dont l'évolution est assez comparable à celle des tumeurs des rats témoins, pourtant aucune métastase pulmonaire n'est détectée chez ces animaux. Diverses hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette absence de foyer métastatique.

Lorsque la thérapie est administrée par voie intratumorale, des cellules tumorales incorporent les lipoplexes et maintiennent au niveau de la tumeur un taux d'expression d'endostatine suffisamment élevé pour empêcher la mise en place de nouveaux vaisseaux, provoquer un accroissement de la nécrose tumorale et prévenir la dispersion métastatique des cellules tumorales. L'effet observé est dans ce cas imputable à l'action locale de l'endostatine produite par les cellules tumorales qui se combine à l'effet de l'endostatine délivrée par les lipoplexes dans les cellules endothéliales.

L'utilisation des liposomes comme vecteurs de gènes apparaît comme la méthode de transfection la plus sûre *in vivo* ; il a toutefois été montré que leur administration par voie intraveineuse initie une production importante de cytokines pro-inflammatoires (Whitmore *et al.* 1999 ; Tan *et al.*, 1999). Cette production est due en grande partie aux motifs CpG non méthylés présents sur le plasmide produit par des bactéries. Ces motifs CpG non méthylés entraînent la reconnaissance de l'ADN bactérien comme élément étranger (Krieg *et al.*, 1995) et la production en réponse de cytokines pro-inflammatoires. Ces cytokines (TNF α , IFN γ , IL-12 entre autres) vont activer une réponse immunitaire et sont responsables d'un puissant effet

antitumoral chez la souris (Whitmore *et al.*, 1999 ; Dow *et al.*, 1999). Ces auteurs pensent que, dans une certaine mesure, l'inhibition de la croissance tumorale observée lors de l'application de la thérapie génique est due à l'activation de la réponse immunitaire. Les réponses thérapeutiques observées seraient dues en partie à cette réponse immunitaire induite par l'introduction dans l'organisme d'ADN bactérien.

Dans nos études nous pouvons dire que la réponse immunitaire obtenue en réaction à l'injection de lipoplexes n'est pas suffisante pour induire ni pour expliquer le retard de croissance et surtout l'inhibition de la dissémination métastatique observée au cours du traitement par l'ADNc d'endostatine. En effet, les animaux témoins reçoivent eux aussi les mêmes quantités d'ADN plasmidique produit par des bactéries, que les rats traités par l'endostatine, ils vont présenter la même réaction immunitaire. Pourtant chez ces animaux les tumeurs évoluent normalement. Ceci indique clairement que la réponse des cytokines ne peut expliquer l'inhibition de la dissémination métastatique observée pour les animaux recevant les lipoplexes/pSecEndo. Cette prévention est le résultat de la seule activité angiogénique de l'endostatine. O'Reilly a le premier mis en évidence les capacités de l'endostatine à réduire la croissance tumorale et prévenir la dispersion métastatique (O'Reilly *et al.*, 1997). De nombreuses études de thérapie génique menées en utilisant l'ADNc de l'endostatine dans divers vecteurs viraux, ou non, présentent les mêmes résultats (Sauter *et al.*, 2000 ; Jin *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003).

Au cours de cette étude une question s'est posée : une augmentation du taux d'endostatine circulante pourrait elle expliquer la prévention de la dissémination métastatique ?

L'endostatine produite par les cellules endothéliales transfectées gagnerait par voie sanguine des organes cibles tels que les poumons et y jouerait là son rôle protecteur du développement métastatique. Afin de vérifier cette possibilité nous avons dosé l'endostatine

circulante et nous n'avons pas pu mettre en évidence l'augmentation du taux d'endostatine plasmatique au cours du traitement par voie intraveineuse. Ce résultat est également rapporté par d'autres équipes utilisant des techniques de transfert liposomales ou virales (Feldman et Libutti, 2000b ; Jouanneau *et al.*, 2001). Ces études ont en commun le fait de ne pas avoir d'endostatine circulante augmentée mais d'induire un retard de la croissance tumorale.

Dans une expérience similaire, Chen a pu mettre en évidence une élévation significative de l'endostatine circulante après administration intraveineuse de lipoplexes (Chen. *et al.*, 2000). Chen postule que cette augmentation d'endostatine sérique est due à l'injection intraveineuse des lipoplexes et est en partie responsable de la régression tumorale qu'il obtient. Feldman a montré peu après Chen, que les taux d'endostatine circulante ne sont pas plus élevés après traitement et que la réduction tumorale est un effet direct du ciblage des lipoplexes sur les vaisseaux tumoraux (Feldman et Libutti, 2000b). Nos résultats rejoignent les conclusions de Feldman. De plus, nous pensons que l'existence de nombreuses enzymes capables de dégrader rapidement l'endostatine est aussi une raison expliquant l'absence d'augmentation de l'endostatine circulante (Ferrerias *et al.*, 2000). Nous pouvons donc supposer que si de l'endostatine est libérée dans le plasma elle est dégradée rapidement avant de pouvoir gagner d'autres organes et d'y exercer son effet protecteur.

Nos résultats indiquent que l'endostatine agit au niveau de la tumeur primaire : en inhibant la mise en place de la néovascularisation tumorale, elle prive les cellules tumorales de leur principale voie de dissémination, et les empêche de quitter la tumeur primaire et de former des foyers métastatiques. L'absence de métastases au terme du traitement est un bon indicateur de l'efficacité de la thérapie génique antiangiogénique utilisant l'ADNc d'endostatine.

Si l'endostatine prévient la dissémination métastatique chez tous les rats recevant les lipoplexes/pSecEndo, des différences sont notées quant à l'évolution de la tumeur primaire. Elles peuvent être expliquées par le fait qu'au moment de la greffe tumorale, certains fragments tissulaires ont une capacité proliférative plus importante que d'autres, à cause de l'hétérogénéité du tissu tumoral. Ces greffons prolifèrent plus vite et mettent en place une vascularisation un peu plus tôt que les autres tumeurs. L'endostatine est donc moins efficace à ralentir la croissance tumorale. Nous pouvons supposer que lorsque le traitement est débuté, les tumeurs de certains rats ont dépassé un stade nommé « fenêtre de plasticité ». Ce terme désigne le délai existant entre la formation des vaisseaux par les cellules endothéliales et la mise en place de la paroi vasculaire autour des néo-vaisseaux et durant lequel les cellules endothéliales, sont plus sensibles aux agents antiangiogéniques (Benjamin *et al.*, 1998). Lorsque le traitement débute et que la vascularisation tumorale est encore immature, l'endostatine cible plus facilement les cellules endothéliales et possède une plus grande efficacité. Cela se traduit par une diminution de la vascularisation tumorale et entraîne un retard de croissance de la tumeur important et une plus forte apoptose tumorale.

Au contraire si le traitement débute lorsque certains vaisseaux ont déjà mis en place la protection par les péricytes, l'action de l'endostatine est moins efficace. Les effets de la thérapie sont moins visibles, ce qui correspond à certaines progressions tumorales que nous avons obtenu. Ceci indique la nécessité d'appliquer le traitement antiangiogénique avec l'endostatine dès le début de la croissance tumorale. Nos résultats sont confortés par ceux de Bergers qui montre que l'endostatine a un effet antiangiogénique plus puissant quand on cible les tumeurs au début de leur expansion (Bergers *et al.*, 1999). Cette fenêtre de plasticité fournit une « fenêtre thérapeutique », au cours de laquelle le ciblage des vaisseaux immatures est idéal (Bergers *et al.*, 2003). En effet, pendant ce laps de temps, il est possible d'inhiber à la fois la prolifération des cellules endothéliales et d'empêcher la mise en place des péricytes.

Bergers a récemment montré que l'association de deux agents l'un inhibiteur du récepteur du PDGF (le SU6668) et l'autre inhibiteur de VEGFR (le SU5416) entraîne une régression tumorale plus importante que lorsque chaque agent est utilisé séparément (Bergers *et al.*, 2003). Ceci laisse entrevoir de nouvelles orientations pour la thérapie génique antiangiogénique associant l'inhibition des cellules endothéliales à des agents ciblant les péricytes.

IV. L'ADNc de l'endostatine induit *in vivo* une diminution de la vascularisation tumorale

L'efficacité d'un traitement antiangiogénique est certes évaluée par sa capacité à ralentir la croissance tumorale et empêcher le développement des métastases, mais la fonction première d'un tel agent est de réduire la vascularisation tumorale. Nous nous sommes donc intéressé à l'effet de l'endostatine sur la densité vasculaire de la tumeur.

Une des caractéristiques du réseau vasculaire tumoral est sa structure chaotique : les vaisseaux tumoraux sont de diamètre irrégulier, les petits vaisseaux surnuméraires et immatures peuvent être regroupés dans des régions et laisser certaines zones privées de toute vascularisation. Cette organisation, que nous retrouvons dans les tumeurs témoins pourrait s'expliquer par l'existence d'un déséquilibre entre les facteurs pro et antiangiogéniques (Jain, 2001). Les effets de l'endostatine sur la vascularisation tumorale se traduisent par une diminution de la densité vasculaire observée à la périphérie de la tumeur, région normalement la plus vascularisée. Les vaisseaux sont de diamètres plus réguliers que dans les tumeurs témoins, les capillaires surnuméraires ont disparu sous l'effet de l'endostatine. Nos résultats indiquent que l'endostatine inhiberait la mise en place de ces capillaires surnuméraires, la vascularisation de la tumeur est diminuée lui permettant d'évoluer mais plus lentement. Ceci

expliquerait le ralentissement de croissance tumorale observé à la place de la régression totale attendue (Hlatky *et al.*, 2002).

Si *in vitro* nous avons pu induire l'apoptose des cellules endothéliales à l'aide de l'endostatine, *in vivo* nous n'avons pas constaté d'augmentation des cellules endothéliales apoptotiques. Par contre une augmentation des cellules tumorales apoptotiques consécutive à la diminution de la vascularisation est mise en évidence. En empêchant la mise en place de nouveaux vaisseaux, l'endostatine induit de manière indirecte l'apoptose des cellules tumorales, comme déjà observé par plusieurs équipes (Sauter *et al.*, 2000 ; Griselli , 2000).

Toutefois, l'absence de cellules endothéliales apoptotiques génère des interrogations quant au mode d'action de l'endostatine. Dans une application de thérapie génique antiangiogénique similaire à notre étude une équipe a mis en évidence des effets thérapeutiques similaires à ceux que nous rapportons : une inhibition importante de l'angiogenèse tumorale, une induction de l'apoptose des cellules tumorales ainsi qu'une diminution de la densité vasculaire (Li *et al.*, 2003). D'après nos résultats et ceux du groupe de Li, il semble que l'endostatine soit *in vivo* plus un inhibiteur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales qu'un inducteur de la mort cellulaire. Cette activité n'est pas en contradiction avec les mécanismes d'action proposés pour l'endostatine. L'endostatine est certes décrite comme un inducteur de l'apoptose des cellules endothéliales, mais elle possède également une action inhibitrice sur la migration des cellules endothéliales (Dhanabal *et al.*, 1999, Schichiri et Hirata, 2000).

Des études complémentaires sont en cours afin de rechercher le mode d'action *in vivo* de l'endostatine.

Ces derniers temps l'endostatine se retrouve au centre d'un débat (Marshall, 2002).

En effet, certaines équipes (Tanaka *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2000 ; Pawliuk *et al.*, 2002) n'ont pas réussi à obtenir de régression tumorale partielle ou complète comme cela a été démontré par Folkman sur un modèle de carcinome pulmonaire de Lewis (O'Reilly *et al.*, 1994 ; Boehm *et al.*, 1997). Dans une étude réalisée sur un modèle de lymphome murin Eisterer met en évidence une absence d'effet thérapeutique, les tumeurs ne régressant pas alors qu'une augmentation de l'endostatine plasmatique est décelée (Eisterer *et al.*, 2002). Ces résultats amènent ces équipes à remettre en question l'efficacité de l'endostatine.

Nous pensons que ces résultats pourraient s'expliquer par la possibilité qu'ont certaines tumeurs, telles que les mélanomes, à former des néovaisseaux sanguins, non pas à l'aide de cellules endothéliales mais en utilisant des cellules tumorales dont le rôle est de permettre la vascularisation de la tumeur (Maniotis *et al.*, 1999 ; Chang *et al.*, 2000). Si cette théorie a été sujette à controverse, de plus en plus de faits montrent que d'autres tumeurs peuvent mettre en place cette pseudo vascularisation (Hendrix *et al.*, 2003). Les néovaisseaux sont alors composés d'une mosaïque de cellules endothéliales et tumorales, rendant toute thérapie antiangiogénique beaucoup moins efficace voire totalement inefficace. Il serait intéressant de déterminer la présence ou non de ces vaisseaux dans l'ostéosarcome greffable du rat ; ce critère pourrait nous permettre d'adapter au mieux le traitement à appliquer.

Les résultats obtenus lors de nos travaux mettent en évidence la possibilité d'utiliser l'endostatine sous forme de thérapie génique dans le traitement de l'ostéosarcome. Si nous n'obtenons pas de régression totale de la tumeur pour tous les animaux traités, nous sommes en mesure de prévenir la mise en place des métastases pulmonaires, qui dans le cas de l'ostéosarcome sont responsables de 80% des décès (Estlin, 2002). Un tel résultat met en valeur les capacités de la thérapie génique antiangiogénique appliquée en traitement néoadjuvant de la chirurgie de l'ostéosarcome.

V. Les liposomes cationiques administrés par voie intraveineuse permettent un ciblage tumoral des ADNc

Le choix d'appliquer une thérapie génique non virale repose sur la plus grande sécurité d'utilisation de ces vecteurs. De plus, l'application intraveineuse de la thérapie génique antiangiogénique implique l'utilisation de vecteurs possédant une affinité élevée pour les vaisseaux tumoraux, ce qui est le cas des liposomes cationiques développés par Munich Biotech AG et dont nous nous servons. L'absence d'augmentation du taux d'endostatine circulante après administration intraveineuse des lipoplexes confirme le ciblage spécifique des néovaisseaux tumoraux par les liposomes mis en évidence par l'étude de leur biodistribution dans notre modèle expérimental animal. Thurston et plus récemment Krasnici montrent que l'accumulation de ces liposomes cationiques et lipoplexes est 3,3 fois plus importante dans la tumeur que dans les tissus musculaires environnants (Thurston *et al.*, 1998 ; Krasnici *et al.*, 2003).

Le ciblage spécifique de la tumeur par les liposomes et le fait que nous n'observons pas d'augmentation de l'endostatine sérique sont des arguments en faveur de l'administration intraveineuse de la thérapie génique utilisant des vecteurs de gènes spécifiques de tumeurs, limitant le risque de diffusion dans l'organisme la protéine antiangiogénique et la perturbation des processus normaux de l'angiogenèse qui en résulteraient (Dixelius *et al.*, 2002).

VI. Apport de l'imagerie médicale dans le suivi du traitement antiangiogénique

Au cours de nos études, l'utilisation de méthodes d'imagerie médicale a permis un meilleur suivi de la réponse tumorale au traitement. Les deux techniques utilisées sont basées sur la fixation de traceurs radiomarqués, l'un étant un indicateur de l'état métabolique de la tumeur, l'autre de la vascularisation.

Le développement de ces techniques devrait permettre une meilleure estimation du volume tumoral et de la vascularisation tumorale avant le début du traitement des animaux. L'évaluation de la vascularisation de la tumeur avant traitement pourrait être un indice quant à la réponse au traitement que l'on peut attendre. Les deux méthodes d'imagerie (PET Scan et angioscintigraphie) sont complémentaires, comme le montre l'évolution parallèle des fixations tumorales de ^{18}F FDG et de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ que nous observons, confirmant l'interdépendance des deux paramètres surveillés : métabolisme et vascularisation de la tumeur.

Ces techniques ont une utilité dans le suivi de la réponse au traitement. Elles permettent de prévoir la réponse tumorale au traitement appliqué. En effet, des changements biologiques et métaboliques se manifestent plus tôt en réponse au traitement que des changements morphologiques, c'est à dire qu'une évolution du volume tumoral (Brenner, 2003).

Si l'angioscintigraphie est une méthode moins résolutive que le PET Scan, elle est toutefois utile dans le suivi des thérapies antiangiogéniques. Tout comme pour le métabolisme, des changements dans la vascularisation tumorale se produisent avant tout changement dans le volume de la tumeur. La thérapie antiangiogénique appliquée avec un agent tel que l'endostatine va inhiber la croissance des cellules endothéliales avant celle des cellules tumorales, une diminution de la vascularisation se produit donc avant une diminution

du volume. De la même manière une évolution du métabolisme tumoral se produit et est détectable par le PETScan avant tout changement morphologique de la tumeur.

Les images obtenues grâce à ces deux techniques nous permettent d'adapter le protocole thérapeutique et de déterminer s'il est efficace ou non et le cas échéant de changer l'orientation thérapeutique en cours de traitement. Des améliorations peuvent être apportées. Elles concernent essentiellement l'angioscintigraphie puisque de précédentes études ont permis de fixer les conditions optimales à la réalisation de l'examen de tomoscintigraphie au ^{18}F FDG pour les rats (Monteil, communication personnelle).

Les résultats obtenus au terme de ce travail ouvrent des voies pour de nouvelles études.

Nous avons évalué les gènes de l'endostatine et de la TnI, mais dans ce modèle d'ostéosarcome l'endostatine est-elle l'agent antiangiogénique le plus efficace ? Dernièrement, a été rapportée pour l'endostatine une différence d'efficacité suivant le modèle tumoral (Dhkissi *et al.*, 2003). Une comparaison de l'efficacité de l'endostatine par rapport à d'autres gènes antiangiogéniques nous apparaît donc pertinente.

Nous avons évalué la thérapie génique antiangiogénique comme seul traitement de l'ostéosarcome. Une association de thérapie génique antiangiogénique et de chimiothérapie ou radiothérapie pourrait présenter des résultats intéressants. En effet, le groupe de Shi a montré que l'endostatine pouvait entraîner une meilleure réponse à la radiothérapie dans un modèle de cancer de colon (cellules HT29) (Shi *et al.*, 2003). L'endostatine pourrait, dans le cas de l'ostéosarcome, potentialiser l'effet de la radiothérapie.

CONCLUSION

Le transfert du gène de l'endostatine sous forme complexée à des liposomes est efficace. Le traitement de rats porteurs d'un ostéosarcome à l'aide de ces lipoplexes injectés par voie intratumorale ou intraveineuse entraîne le ralentissement de croissance tumorale et la prévention de la dissémination métastatiques comme conséquences de la diminution du réseau vasculaire tumoral.

Depuis la mise en évidence de l'implication de l'angiogenèse dans le processus tumoral (Folkman, 1971), l'intérêt accordé à ce processus n'a cessé de grandir. Les meilleures connaissances de ce mécanisme et des agents régulateurs impliqués permettent l'amélioration des stratégies antiangiogéniques.

Toutefois, il est de plus en plus évident que le ciblage d'une étape de l'angiogenèse est insuffisant pour inhiber ce processus complexe et induire à lui seul la régression totale de la tumeur. Des thérapies combinées impliquant des inhibiteurs de l'angiogenèse sont à l'étude. Une de ces associations qui est dorénavant déjà en phase d'essais cliniques consiste à cibler les cellules endothéliales et les cellules tumorales, en associant l'antiangiogenèse à la chimiothérapie conventionnelle ou la radiothérapie (O'Reilly, 2002).

On peut également multiplier les cibles de la thérapie antiangiogénique.

Des associations d'inhibiteurs impliqués dans des étapes différentes de l'angiogenèse permettraient de la réduire davantage. Une des associations possibles combine un inhibiteur des étapes précoces de l'angiogenèse (type endostatine) à un agent empêchant le recrutement des pericytes par les cellules endothéliales. Cette association, qui maintient les vaisseaux dans un état immature et les rend donc plus sensibles aux composés antiangiogéniques, a récemment produit des résultats encourageants (Bergers *et al.*, 2003). L'idéal serait de combiner l'endostatine à des composés visant à détruire les récepteurs endothéliaux à la sphingosine 1 phosphate impliqués dans la migration des pericytes.

BIBLIOGRAPHIE

A

Abedi H et Zachary I (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem*, 272, 15442-15451.

Ahmad, I., Longenecker, M., Samuel, J., *et al.* (1993). Antibody-targeted delivery of doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes can eradicate lung cancer in mice. *Cancer Res.* 53, 1484-1488.

Aksentijevich, I., Cardarelli, C.O., Pastan, I., *et al.* (1996). Retroviral transfer of the human MDR1 gene confers resistance to bisantrene-specific hematotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 2, 973-980.

Allouche, M., Delbrück, H.G., Klein, B., *et al.* (1980). Malignant bone tumours induced by a local injection of colloidal radioactive ¹⁴⁴Cerium in rats as a model for human osteosarcomas. *Int. J. Cancer* 26, 777-782.

Arndt, C.A.S., et Crist, W.M. (1999). Common musculoskeletal tumors of childhood and adolescence. *N.E.J.M.* 341, 342-351.

Asher, A., Mule, J., Kasid, A., *et al.* (1991). Murine tumor cells transduced with the gene of tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.* 146, 3227-3234.

Audouy, S.A.L., de Leij, L.F.M.H. Hoekstra, D., *et al.* (2002). *In vivo* characteristics of cationic liposomes as delivery vectors for gene therapy. *Pharm. Res.* 19, 1599-1605.

B

Baker, S.J., Markowitz, S., Fearon, E.R., *et al.* (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type *p53*. *Science* 249, 912-915.

Baldwin, A.S., Kittler, E.L.W., et Emerson, C.P. (1985). Structure, evolution, and regulation of a fast skeletal muscle troponin I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 8080-8084.

Beltinger, C., Uckert, W., et Debatin, K.M. (2001). Suicide gene therapy for pediatric tumor. *J. Mol. Med.* 78, 598-612.

Benjamin, L. E., Hermo, I., et Keshet E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125, 1591-1598.

Bergers G, Javaherian K, Lo KM, *et al* (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science* 284, 808-812.

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., *et al.* (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J. Clin. Invest.* 111, 1287-1295.

Biagi, E., Rousseau, R.F., Yvon, E., *et al.* (2002). Cancer vaccines : dream, reality, or nightmare ? *Clin. Exp. Med.* 2, 109-118.

Bilbao, G., Feng, M., Rancourt, C., *et al.* (1997). Adenoviral/retroviral vector chimeras : a novel strategy to achieve high-efficiency stable transduction *in vivo*. *FASEB. J.* 11, 624-63.

Boczkowski, d., Nair, S.K., Snyder, D., *et al.* (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Exp. Med.* 184, 465-472;

Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., *et al.* (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 390, 404-407.

Boehm-Viswanathan, T. (1999). Why angiogenesis inhibition? *Int. J. Mol. Med.* 4, 413-417.

Bollard, C.M., Rossig, C., Calonge, M.J., *et al.* (2002). Adapting a transforming growth factor beta-related tumor protection strategy to enhance antitumor immunity. *Blood* 99, 3179-3187.

Brenner, S., et Malech, H.L. (2003). Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy. *B.B.A.* 1640, 1-24.

Brenner, W., Bohuslavizki, K. H., et Eary, J., (2003). PET imaging of osteosarcoma. *J.Nucl. Med.* 44, 930-942.

Brignole, C., Marimpietri, D., Gambini, C. *et al.* (2003). Development of Fab'fragments of anti-GD(2) immunoliposomes entrapping doxorubicin for experimental therapy of human neuroblastoma. *Cancer Lett.* 197, 199-204.

Brooks PC., Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., *et al.* (1994). Integrin Alpha-v Beta-3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79, 1157-1164.

Brouty, B.D. et Zetter, B.R. (1980). Inhibition of cell motility by interferon. *Science* 208, 516-518.

©

Caluser, C., Abdel-Dayen, H.M. et Macapiniac, H.A. (1994). The value of thallium and three-phase bone scans in the evaluation of bone and soft tissue sarcomas. *Eur. J. Nucl. Med.* 21, 1198-1205.

Campanacci, M. et Cervellati, C. (1975). Osteosarcoma. A review of 345 cases. *Ital. J. Orthop.Traum.* 1, 5-22.

Cao, Y., O'Reilly, M.S., Marshall, B., *et al.* (1998). Expression of angiostatin cDNA in a murine fibrosarcoma suppresses primary tumor growth and produces long-term dormancy of metastases. *J. Clin. Invest.* 101, 1055-1063.

Carlsson, G., Gullberg, B., et Hafstrom, L. (1983). Estimation of liver tumor volume using different formulas. An experimental study in rats. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 105, 589-599.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9, 653-660.

Caruso, M., Panis, Y., Gangadeep, S., *et al.* (1993). Regression of established macroscopic liver metastase after *in situ* transduction of a suicide gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 7024-7028.

Catros-Quemener, V., Bouet, F., et Genetout, N. (2003). Immunité anti-tumorale et thérapies cellulaires du cancer. *Méd. Sci.* 19, 43-53.

Chang, Y. S., di Tomaso, E., McDonald, D. *et al.* (2000). Mosaic blood vessels in tumors : frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 97, 14608-14613.

Chang, Z., Choon, A. et Friedl, A. (1999). Endostatin binds to blood vessels in situ independent of heparan sulfate and does not compete for fibroblast growth factor-2 binding. *Am J Pathol* 155, 71-76.

Charrisoux, J.L., Grossin, L., Leboutet M.J., *et al.* (1999) Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and gancyclovir. *Anticancer Res.* **19**, 77-80.

Chen, C.T., Lin, J., Li, Q., *et al.* (2000). Antigiogenic gene therapy for cancer via systemic administration of adenoviral vectors expressing secretable endostatine. *Hum. Gene ther.* 11, 1983-1996.

Chen, Q.R., Kumar, D., Sanford, A., *et al.* (1999). Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res.* 59, 3308-3312.

Chen, S.Y., Huang, H.J., Nagane, M., *et al.* (1996). Suppression of glioblastoma angiogenicity and tumorigenicity by inhibition of endogenous expression of vascular endothelial growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 8502-8507.

Cheon, J., Ko, S.C., Gardner, T.A., *et al.* (1997). Chemogene therapy for osteosarcoma: osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model. *Cancer Gene Ther.* 4, 359-365.

Cheresh D.A. (1993). Integrins : Structure, function and biological properties. *Adv Mol Cell Biol* 6, 225-252.

D

D'Amato, R.J., Loughnan, M.S., Flynn, E., *et al.* (1994). Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *91*, 4082-4085.

Dahlin, D.C., et Unni, K.K. (1986). Bone tumors. General aspects and data on 8542 cases. *Charles C. Thomas*, Ed. Springfield, 522 p.

Davidoff, A.M., Leary, M.A., Ng, C.Y., *et al.* (2001). Gene therapy-mediated expression by tumor cells of the angiogenesis inhibitor flk-1 results in inhibition of neuroblastoma growth *in vivo*. *J. Pediatr. Surg*; *36*, 30-36.

Davis, H.L., Demeneix, B.A., Quantin, B., *et al.* (1993). Plasmid DNA is superior to viral vector for direct gene transfer into adult skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* *4*, 733-740.

Dhanabal, M., Ramchandran, R., Volk, R., *et al.* (1999 a). Endostatin: Yeast production, mutants, and antitumor effect in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* *59*, 189-197.

Dhanabal, M., Ramchandran, R., Watermann, M. J. F., *et al.* (1999 b). Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* *274*, 11721-11726.

Dhanabal, M., Volk, R., Ramchandran, R., *et al.* (1999 c). Cloning, expression, and *in vitro* activity of human endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *258*, 345-352.

Dkhissi, F., Lu, H., Soria, C., *et al.* (2003). Endostatin exhibits a direct antitumor effect in addition to its antiangiogenic activity in colon cancer cells. *Hum. Gene Ther.* *14*, 997-1008.

Dow, S.W., Fradkin, L.G., Liggitt, D.H., *et al.* (1999). Lipid-DNA complexes induce potent activation of innate immune responses and antitumor activity when administered intravenously. *J. Immunol.* *163*, 1552-1561.

Dranoff, G., Jaffee, E., Lazenby, A., *et al.* (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* *90*, 3539-3543.

E

Eilber, F.R., et Rosen, G. (1989). Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma. *Semin. Oncol.* *16*, 312-323.

Eisterer, W., Jiang, X., Bachelot, T., *et al.* (2002). Unfulfilled promise of endostatin in a gene therapy-xenotransplant model of human acute lymphocytic leukaemia. *Mol. Ther.* *5*, 352-359.

Estlin, E.J. (2002). Novel targets for therapy in pediatric oncology. *Cur. Drug Targ.* *2*, 141-150.

F

- Fan, T.P.D., Jagger, R., et Bicknell, R. (1995). Controlling the vasculature : angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *T.I.P.S.* 16, 52-66.
- Farah, C.S., et Reinnach, F.C. (1995). The troponin complex and regulation of muscle contraction. *FASEB J.* 9, 755-767.
- Feldman, A. L., et Libutti, S. K. (2000 a). Progress in antiangiogenic gene therapy of cancer. *Cancer.* 89 1181-1194.
- Feldman, A. L., et Libutti, S. K. (2000 b). Correspondence re : Q-R Chen *et al.* Liposomes complexed to plasmids encoding angiostatin and endostatin inhibit breast cancer in nude mice. *Cancer Res.* 60.
- Feldman, A. L., Restifo, N.P., et Alexander, H.R.. (2000 c). Antiangiogenic gene therapy of cancer utilizing a recombinant adenovirus to elevate systemic endostatin levels in mice. *Cancer Res.* 60, 1503-1506.
- Feldman, L., et Rouleau, C. (2002). Troponin I inhibits capillary endothelial cell proliferation by interaction with the cell's b-FGF receptor. *Microvasc. res.* 63, 41-49.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., *et al.* (1987). Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84, 7413-7417.
- Felgner, P.L. (1995). The evolving role of liposomes in gene delivery. *J. Lipos. Res.* 5, 725-734.
- Felgner, P.L., Barenholz, Y., Behr, J.P., *et al.* (1997). Nomenclature for synthetic gene delivery systems. *Hum. Gene Ther.* 8, 511-512.
- Ferguson, W.S., et Goorin, A.M. (2001). Current treatment of osteosarcoma. *Cancer Invest.* 19, 292-315.
- Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., *et al.* (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669-676.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., *et al.* (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Let.* 486, 247-251.
- Finney, H.C., Lawson, A.D.G., Bebbington, C.R., *et al.* (1998). Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J. Immunol.* 161, 2791-2797.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182-1186.
- Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependant? *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 4-6.
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.* 1, 27-31.

Fukumori, T., Nishitani, M., Onishi, T., *et al.* (2002). Expression of angiostatin cDNA in a murine renal cell carcinoma suppresses tumor growth *in vivo*. *Urology*. 59, 973-977.

Fussenegger, P. (2001). The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies. *Biotechnol. Prog.* 17, 1-15.

G

Gasmi, M., Glynn, J., Jin, M.J., *et al.* (1999). Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J. Virol.* 73, 1828-1834.

Giuliani, I., Bertinchant, J.P., Granier, C., *et al.* (1999). Determination of cardiac troponinI forms in the blood of patients with acute myocardial infarction and patients receiving crystalloids or cold blood cardioplegia. *Clin. Chem.* 45; 212-222.

Goldmann, C.K., Kendall, R.L., Cabrera, G., *et al.* (1998). Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc. Natl; acad. Sci. USA.* 95, 8795-8800;

Green, N.K., et Seymour, L.W. (2002). Adenovirus vectors : systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther.* 12, 1036-1042.

Griffioen, A., et Molema, G. (2000). Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardio vascular diseases and chronic inflammation. *Pharmacol. Rev.* 2, 237-268.

Grossin, L., Charissoux, J.L., Teissier, M.P., *et al.* (1999) Selective killing of osteosarcoma cells in culture after retroviral mediated gene transfer of a herpes simplex thymidine kinase suicide gene. *Anticancer Res.* 19, 71-16.

Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Mir, L.M., *et al.* (2003). Direct gene transfer into rat articular cartilage by *in vivo* electroporation. *FASEB J.* 17, 829-835.

H

Hanahan, D., et Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 86, 353-364.

Hendrix, M. J. C. , Seftor, E. A., Hess, A. R., *et al.* (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nature Reviews.* 3, 411-420.

Herbst R.S., Hess K.R., Tran H.T., *et al.* (2002). Phase I study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 20, 3792-3803.

Hernigou, P., Thiery, J.P., Benoit, J.P., *et al.* (1987). Etude expérimentale sur l'ostéosarcome d'une chimiothérapie locale diffusant à partir du ciment acrylique chirurgical et du plâtre. *Rev. Chir. Orthop.* 73, 517-529.

Hlatky, L., Hahnfelddt, P., et Folkman, J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy : microvessel density, what itdoes and doesn't tell us. *J. Natl; Cancer Inst.* 883-893.

Hoganson, D.K., Batra, R.K., Olsen, J.C. *et al.* (1996). Comparison of the effects of three different toxin genes and their levels of expression on cell growth and bystander effect in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 56, 1315-23.

Hohenester, E., Takako, S., Olsen, B.R. (1998). Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5 Å resolution. *E.M.B.O.* 17, 1656-1664.

Hurwitz, M.Y., Marcus, K.T., Chevez-Barrios, P. *et al.* (1999) Suicide gene therapy for treatment of retinoblastoma in a murine model. *Hum Gene Ther.* 10, 441-448

Hüser, D., Weger, S., et Heilbronn, R. (2002). Kinetics and frequency of adeno-associated virus site-specific integration into human chromosome 19 monitored by quantitative real-time PCR. *J. Vir.* 15, 7554-7559.

II

Im, S.A., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., *et al.* (1999). Antigiogenesis treatment for gliomas transfer of antisens-vascular endothelial growth factor inhibits tumor growth *in vivo*. *Cancer Res.* 59, 895-900.

Inoue, T., et Krumlauf, R. (2001). An impulse to the brain-using *in vivo* electroporation. *Nat. Neurosci.* 4-S, 1156-1158.

Ingber, D., Fujita, T., Kishimoto, S., *et al* (1990). Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 348, 555-557

JJ

Jain, R.K., et Mumm, L.L. (2000). Leaky vessels ? Call ang 1 ! *Nat. Med.* 6, 131-132.

Jain, R. K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : a new paradigm for combination therapy. *Nature Med.* 7,

Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nature Med.* 9, 685-693.

Jasmin, C., Allouche, M., Jude, J.G., *et al.* (1982). Un modèle expérimental d'ostéosarcome chez le rat. *Sem. Hop. Paris* 58, 1684-1689.

Jia, S.F., Worth, L., Densmore, C.L., *et al.* (2003). Aerosol gene therapy with PEI: IL-12 eradicated osteosarcoma lung metastases. *Clin; Cancer Res.* 9, 3462-3468.

Jin, X., Bookstein, R., Wills, K., *et al.* (2001). Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 12, 982-989;

Jouanneau, E., Alberti, L., Nejjari, M., *et al.* (2001). Lack of antitumor activity of recombinant endostatin in a human neuroblastoma xenograft model. *J Neuro-oncol.*, 51, 11-18.

K

Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., *et al.* (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genet.* 17, 314-317.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes : structure, assembly and role in tumor angiogenesis. *Nature Review* 3, 422-433.

Kaplan, J.C., et Delpéch, M. (1992). Biologie moléculaire et Médecine. De la biologie à la médecine. Paris : Médecines Sciences, Flammarion, 2me Edition. 610 p.

Kaste, S.C., Pratt, C.B., Cain, A.M., *et al.* (1999). Metastases detected at the time of diagnosis of primary pediatric extremity osteosarcoma at diagnosis : imaging features. *Cancer.* 86, 1602-1608.

Kerbel, R. (1997). A cancer therapy resistant to resistance. *Nature.* 390, 335-336.

Kerbel, R., et Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer.* 2, 727-739.

Kikuchi, A., Aoki, Y., Sugaya, S., *et al.* (1999). Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Hum. Gene Ther.* 10, 947-955.

Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., *et al.* (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature.* 362, 841-844.

Kirn, D., Niculescu-Duvaz, I., Hallden, G., *et al.* (2002). The emerging fields of suicide gene therapy and virotherapy. *Trends Mol Med.* 8(Suppl), S68-73.

Klagsbrun, M., et Moses, M.A. (1999). Molecular angiogenesis. *Chem. Biog.* 6, 217-224.

Klatzmann, D., Cherin, P., Bensimon, G. *et al.*, (1998). A phase I/II dose-escalation study of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase "suicide" gene therapy for metastatic melanoma. Study Group on Gene Therapy of Metastatic Melanoma. *Hum. Gene Ther.* 9, 2585-94.

Kleinerman, E.S., Cano, J.B., Johnston, D.A., *et al.* (1995). Efficacy of liposomal muramyl tripeptide (CGP 19835A). in the treatment of relapsed osteosarcoma. *Am. J Clin. Oncol.* 18, 93-99.

Kolber D.L., Knisely T.L. et Maione T.E. (1995). Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst.*;87, 304-309.

Kong, H.L., et Crystal, R.G. (1998). Gene therapy strategies for tumor antiangiogenesis. *J Natl Cancer. Inst.* 90, 273-286.

Krasnici, S., Werner, A., Eichhorn, M.E., *et al.* (2003). Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels. *Int. J. Cancer* 105, 561-567.

Krieg, A.M. (1995). CpG DNA: a pathogenic factor in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol.*15, 284-292.

Kunstfeld, R., Wickenhauser, G., Michaelis, U., *et al.* (2003). Paclitaxel encapsulated in cationic liposomes diminishes tumor angiogenesis and melanoma growth in a “Humanized” SCID mouse model. *J. Invest. Dermatol.* 120, 476-482.

L

Lee, R.J., et Low, P.S. (1995). Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 1233, 134-144.

Li, X., Fu, G. F., Fan, Y. R., *et al.* (2003). Potent inhibition of angiogenesis and liver tumor growth by administration of an aerosol containing a transferring-liposome-endostatin complex. *World J.Gastroenterol.* 9, 262-266.

Liu, G., Grossmann, G.A., *et al.* (2001). Biological properties of poly-t-lysine DNA complexes generated by cooperative binding of the polycation. *J. Biol. Chem.* 276, 34379-34387.

Logothetis C.J., Wu K.K., Finn L.D., *et al.* (2001). Phase I trial of the angiogenesis inhibitor TNP-470 for progressive androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res.*;7, 1198-203.

M

Mah, C., Byrne, B.J., et Flotte, T. (2002). Virus-based gene delivery systems. *Clin. Pharmacokinet.* 41,-901-911.

Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., *et al.* (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro* : vasculogenic mimicry. *Am. J. Pathol.* 15, 739-752.

Margolin K., Gordon M.S., Holmgren E., *et al.* (2001). Phase Ib trial of intravenous recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor in combination with chemotherapy in patients with advanced cancer: pharmacologic and long-term safety data. *J Clin Oncol.*;19, 851-856.

Moradpour, D., Compagnon, B., Wilson, B.E. *et al.* (1995). Specific targeting of human hepatocellular carcinoma cells by immunoliposomes *in vitro*. *Hepatology* 22, 1527-1537.

Marshall, E. (2002). Setbacks for endostatin. *Science* 295, 2198-2199.

Maruyama, K., Ishida, O., Takizawa, T. *et al.* (1999). Possibility of active targeting to tumor tissues with liposome. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 40, 89-102.

Mayer, L.D., Tai, L.C., Ko, D.S. *et al.* (1989). Influence of vesicle size, lipid composition, and drug-to-lipid ratio on the biological activity of liposomal doxorubicin in mice. *Cancer Res.* 49, 5922-30.

Mazabraud, A., Gongora, R., Gongora, G. *et al.* (1982). Intérêt de l'étude cinétique au ⁸⁵Sr pour la classification des sarcomes ostéogènes. *Sem. Hop. Paris* 58, 1664-1667.

Mergny, J., Duval-Valentin, G., Nguyen, C. *et al.* (1992). Triple helix specific ligands. *Science* 256, 1681-1684.

Millauer, B., Shawver, L.K., Plate, K.H. *et al.* (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res.* 56, 1615-1620.

Miller, D.G., Adam, M.A., Miller, A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4239-4242.

Miller K.D., Gradishar W., Schuchter L. *et al.* (2002). A randomized phase II pilot trial of adjuvant marimastat in patients with early-stage breast cancer. *Ann Oncol.* 13, 1220-1224.

Mir, L.M., Bureau, M., Gehl, J. *et al.* (1999). High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 4262-4267.

Moolten, F.L. (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase gene : paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res.* 46, 5276-5281.

Mori, S., Ueda, T., Kuratsu, S. *et al.* (1995). Suppression of pulmonary metastasis by angiogenesis inhibitor TNP-470 in murine osteosarcoma. *Int. J. Cancer.* 29, 148-152.

Moriuchi, S., Oligino, T., Krisky D. *et al.* (1998). Enhanced tumor cell killing in the presence of ganciclovir by herpes simplex virus type 1 directed coexpression of human tumor necrosis factor-alpha and *herpes simplex* virus thymidine kinase. *Cancer Res.* 58, 5731-5737.

Morishita, T., Mii, Y., Miyauchi, Y. *et al.* (1995). Efficacy of the angiogenesis inhibitor O-(chloroacetyl-carbamoyl)flumagillol (AGM-1470) on osteosarcoma growth and lung metastasis in rats. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 25, 25-31.

Moses, M.A., Wiederschain, D., Wu, I. *et al.* (1999). Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2645-2650.

N

Nair, S.K., Heiser, A., Boczkowski, D. *et al.* (2000). Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat. Med*; 6, 1011-1017.

Nam, S.M., Kim H.S., Ahn, W.S. *et al.* (1999). Sterically stabilized anti-G(M3), anti-Le(x) immunoliposomes targeting to B16B6. *Oncol. Res.* 11, 9-16.

Nicolau, C. et Papahadjopoulos, D. (1998). Gene therapy: liposomes and gene delivery – a perspective, in: Lasic, D., Papahadjopoulos, D. (Eds.), *Medical applications of liposomes*, Elsevier, 1998, pp. 347-352;

Norman, J., Denham, W., Denham, D. *et al.* (2000). Liposome-mediated, nonviral gene transfer induces a systemic inflammatory response which can exacerbate pre-existing inflammation. *Gene Ther.* 7, 1425-1430.

O

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y. *et al.* (1994 a). Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Shing, Y. *et al.* (1994 b). Angiostatin a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 59, 471-482;

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C. *et al.* (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nature Med.* 2, 689-692.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y. *et al.* (1997). Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88, 277-285.

O'Reilly, M.S. (2002). The combination of antiangiogenic therapy with other modalities. *Cancer J.* 8, 589-599.

Oudrhiri, N., Vigneron, J.P., Peuchmaur, M., *et al.* (1997). Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1651-1656.

Ozaki, T., Schaefer, K.L., Wai, D. *et al.* (2002). Genetic imbalances revealed by comparative genomic hybridization in osteosarcomas. *Int. J Cancer.* 102, 355-365.

P

Park, J.W., Hong, K., Kirpotin, D.B. *et al.* (2002). Anti-HER2 immunoliposomes : enhanced efficacy attributable to targeted delivery. *Clin. Cancer Res.* 8, 1172-1181.

Pawliuk, R., Bachelot, T., Zurkiya, O. *et al.* (2002). Continuous intravascular secretion of endostatin in mice from transduced hematopoietic stem cells. *Mol Ther.*;5, :345-51.

Philip, T., Blay, J.Y., Brunat-Mentigny, M. *et al.* (1999). Standards, options et recommandations pour le diagnostic, le traitement et la surveillance de l'ostéosarcome. *FNCLCC*.

Plebani, M. (2001). Biochemical markers of cardiac damage : from efficiency to effectiveness. *Clinica Chemisca Acta.* 311, 3-7.

Pugh, C.W. et Radcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of HIF system. *Nat. Med.* 9, 677-684.

Pulhkanen, K.J., Laukkanen, J.M., Fuxe, J. *et al.* (2002). The combination of HSV-tk and endostatin gene therapy eradicates orthotopic human renal cell carcinomas in nude mice. *Cancer Gene Ther.* 9, 908-916.

Q

Quirt, I., Bodurth, A., Lohmann, R. *et al.* (2002). Phase II study of marimastat (BB-2516) in malignant melanoma: a clinical and tumor biopsy study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Invest New Drugs.* 20, 431-437.

R

Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P. *et al.* (1993). Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of *mdx* mice. *Nature* 361, 647-650.

Ramchandran, R., Dhanabal, M., Volk, R. *et al.* (1999). Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: Comparison to endostatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 735-739.

Reinish, L.W., Bally, M.B., Loughrey, H.C. *et al.* (1988) Interactions of liposomes and platelets. *Thromb. Haemost.* 60, 518-523.

Rehn, M., Veikkola, T., Kukk-Valdre, E. *et al.* (2001). Interaction of endostatin with integrins implicated in angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 1024-1029

Risau W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671-674

Rols, M.P, Delteil, C., Golzio, M. *et al.* (1998.). *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.* 16, 168-171.

Rooney, C.M., Bollard, C., Huls, M.H. *et al.* (2002). Immunotherapy for Hodgkin's disease; *Ann. Hematol.* S. 39-42.

Rosen, G. and Nirenberg, A. (1985). Neoadjuvant chemotherapy for osteogenic sarcoma: a five year follow-up (T-10) and preliminary report of new studies (T-12). *Prog. Clin. Biol. Res.* 201, 39-51.

Rosenberg, S.A., Packard, B.S., Aebersold, P.M. *et al.* (1988). Use of TIL and IL-2 in the management of malignant melanoma : a preliminary report. *N. Engl. J. Med.* 319, 1676-1680.

Rosenberg, Z.S., Lev, S., Schmahmann, S. *et al.* (1995). Osteosarcoma: subtle, care, and misleading plain film features. *Am. J Roentgencl.* 165, 1209-1214.

Rossig, C., Bollard, C.M., Nuchten, C.M. *et al.* (2002). Epstein-Barr virus-specific human T lymphocytes expressing antitumor chimeric T-cell receptors, potential for improved immunotherapy. *Blood.* 99, 2009-2016.

Roth, M.J., Medeiros, L.J., Elenitoba-Johnson, K. *et al.* (1995). Extramedullary myeloid cell tumors. An immunohistochemical study of 29 cases using routinely fixed and processed paraffin-embedded tissue sections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 119, 790-798.

Ruegg, C., Dormond, O., Foletti, A. *et al.* (2002). Suppression of tumor angiogenesis through the inhibition of integrin function and signaling in endothelial cells: which side to target? *Endothelium.* 9, 151-160.

§

Sacco, M.G., Cato, E.M., Ceruti, R. *et al.* (2001). Systemic gene with anti-angiogenic factors inhibits spontaneous breast tumor growth and metastasis in MMTVneu transgenic mice. *Gene. Ther.* 8, 67-70.

Samulski, R.J., Zhu, X., Xiao, X., *et al.* (1991). Targeted integration of adenoassociated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* 10, 3941-3950.

Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J. *et al.* (1999). Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 18, 6240-6248.

Sauter, B.V., Martinet, O., Zhang, W.J. *et al.* (2000). Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97, 4802-4807.

Scappaticci, F.A., Contreras, A., Smith, R. *et al.* (2001). Statin A-E : a novel angiostatin-endostatin fusion protein with enhanced antiangiogenic and antitumor activity. *Angiogenesis* 4, 263-268.

Schajowicz, F., Sissons, H.A., et Sobin, L.H. (1995). The World Health Organization's histologic classification of bone tumors. *Cancer.* 75, 1208-1213.

Scharfmann, R., Axelrod, J.H., et Verma, I.M. (1991). Long-term *in vivo* expression of retrovirus-mediated gene transfer in mouse fibroblast implants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 4626-4630.

Schimke, R.N., Lowman, J.T., et Cowan, A.B. (1974). Retinoblastoma and osteogenic sarcoma in siblings. *Cancer*. 34, 2077-2079.

Schmidt, W., Mass, G., Buschle, M. *et al.* (1997). Generation of effective cancer vaccines genetically engineered to secrete cytokines using adenovirus-enhanced transfection (AVET). *Gene*. 190, 211-216.

Shen, B.Q., Lee, D.Y. et Zioncheck, T.F. (1999). Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J Biol Chem* 274, 33057-33063.

Shi, W., Teschendorf, C., Muzyczka, N. *et al.* (2002). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of endostatin inhibits angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Gene Ther.* 9, 513-521.

Shi, W., Teschendorf, C., Muzyczka, N. *et al.* (2003). Gene therapy delivery of endostatin enhances the treatment efficacy of radiation. *Radiother. Oncol.* 66, 1-0.

Shichiri, M. et Hirata, Y. (2000). Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J.* 15, 1044-1053.

Shirakawa, T., Ko, S.C., Gardner, T.A. *et al.* (1998). *In vivo* suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis with intravenous osteocalcin promoter-based toxic gene therapy. *Cancer Gene Ther.* 15, 274-280.

Sidky Y.A. et Borden E.C. (1987). Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor- and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res* 47, 5155-5161.

Som, P., Atkins, H.L., Bandoypadhyay, D. *et al.* (1980). A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18). : non-toxic tracer for rapid tumor detection. *J. Nucl. Med.* 21, 670-675.

Soriano, P., Dijkstra, J., Legrand, A. *et al.* (1983). Targeted and non targeted liposomes for *in vivo* transfer to rat liver cells of a plasmid containing the preproinsulin I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 7128-7131.

Springer, C.J., et Niculesco-Duvaz, I. (2000). Prodrug-activating systems in suicide gene therapy. *J. Clin. Invest.* 9, 1161-1167.

Straubinger, R.M., Lopez, N.G., Debs, R.J. *et al.* (1988). Liposome-based therapy of human ovarian cancer : parameters determining potency of negatively charged and antibody-targeted liposomes. *Cancer Res.* 48, 5237-5245.

T

Tabin, C.J., Hoffmann, J.W., Goff, S.P. *et al.* (1982). Adaptation of a retrovirus as an eucaryotic vector transmitting the *herpes simplex* virus thymidine kinase gene. *Mol. Cell. Biol.* 2, 426-436.

Tan, Y., Li, S., Pitt, B. R. *et al.* (1999). The inhibitor role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression *in vivo*. *Human Gene Therapy*; 10, 2153-2161.

Tanaka, T., Cao, Y., Folkman, J. *et al.* (1998). Viral vector targeted antiangiogenic gene therapy utilizing an angiostatin complementary DNA. *Cancer Res.* 58, 3362-3369.

Thomas, J.P., Arzoomanian, R.D., Alberti, D. *et al.* (2003). Phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 21, 223-231.

Thurston, G., McLean, J.W., Rizen, M. *et al.* (1998). Cationic liposomes target endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice. *J. Clin. Inves.* 101, 1401-1413.

Tiberghien. P., Cahn, J.Y., Brion, A. *et al.* (1997). Use of donor T-lymphocytes expressing *herpes simplex* thymidine kinase in allogeneic bone marrow transplantation : a phase I-II study. *Hum. Gene Ther.* 8, 615-624.

Titomirov, A.V., Sukharev, S. et Kistanova, E. (1991). *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA; *Biochim. Biophys. Actua.* 1088, 131-134.

Trinchieri, G. (1993). Interleukin-12 and its role in the generation of T_{H1} cells. *Immunol. Today* 14, 335-337.

Tsunemi, T., Nagoya, S., Kaya, M. *et al.* (2003). Postoperative progression of pulmonary metastasis in osteosarcoma. *Clinical Orthopaedics and Related Research.* 407, 159-166.

V

Van Trommel, M.F., Kroon, H.M., Bloem, J.L. *et al.* (1997). MR imaging based strategies in limb salvage surgery for osteosarcoma of the distal femur. *Skeletal Radiol.* 11, 636-641.

Vijayanathan, V., Thomas, T. et Thomas, T.J. (2002). DNA nanoparticles and development of DNA delivery vehicles for gene therapy. *Biochemistry.* 41, 14085-14094.

Vincent, K.A., Piraino, S.T. et Wadsworth, S.C. (1997). Analysis of recombinant adeno associated virus packaging and requirements for *rep* and *cap* gene product. *J. Virol.* 71, 1897-1905.

W

Wang, G., Dong, Z., Xu, G. *et al.* (1998). The effect of antibody against vascular endothelial growth factor on tumor growth and metastasis. *J Cancer Res Clin Oncol.*;124, 615-620.

Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.

Wheeler, C.J., Felgner, P.L., Tsai, Y.J., *et al.* (1996) A novel cationic lipid greatly enhances plasmid DNA delivery and expression in mouse lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 11454-11459.

Whitmore, M., Li, S. et Huang, L. (1999). LLPD lipopolyplex initiates a potent cytokine and inhibits tumor growth. *Gene Therapy*; 6, 1867-1875.

Wolff, J.A., Dowty, M.E., Jiao, S. *et al.* (1992). Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 103, 1249-59.

Wong, T.K. et Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *B.B.R.C.* 107, 584-587.

Wysocki, P.J., Kowalczyk, D.W., Izycki, D. *et al.* (2001). IL-6 and GM-CSF in tumor rejection model of renal cell cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 495,:379-383.

X

Xu, L., Tang, W.H., Huang, C.C. *et al.* (2001). Systematic *p53* gene therapy of cancer with immunilipoplexes targeted by anti-transferrin receptor scFv. *Mol. Med.* 7, 726-738.

Xu, L., Huang, C.C., Huang, W. *et al.* (2002). Systemic tumor-targeted gene delivery by anti-transferrin receptor scFv-immunoliposomes. *Mol. Cancer Ther.* 1, 337-346.

Y

Yazawa, K., Fisher, W.E. et Brunicardi, F.C. (2002). Current progress in suicide gene therapy for cancer. *World J; Surg.* 26, 783-789.

Ye, C., Feng, C., Wang, S. *et al.* (2002). Antiangiogenic and antitumor effects of endostatin on follicular thyroid carcinoma. *Endocrinology* 143, 3522-3528.

Yoshida, T., Kaneko, Y., Tsukamoto, A. *et al.* (1998). Suppression of hepatoma growth and angiogenesis by a fumagillin derivative TNP470: possible involvement of nitric oxide synthase. *Cancer Res.* 58, 3751-3756.

Z

Zatterstrom, U.K., Felbor, U., Fakal, N. *et al.* (2000). Collagen XVIII/endostatin structure and functional role in angiogenesis. *Cell. Structure and Function.* 25, 97-101.

Zhang, X., Wu, J., Fei, Z. *et al.* (2000). Angiostatin k(1-3) gene for treatment of human gliomas: an experimental study. *Chin. Med; J.* 113, 996-1001.

Zhang, Y., Mukhopadhyay, T., Donehower, L.A. *et al.* (1993). Retroviral vector-mediated transduction of K-ras antisense RNA into human lung cancer cells inhibits expression of the malignant phenotype. *Hum. Gene Ther.* 4, 451-60.

Zhdannov, R.I., Podobed, O.V. et Vlassov, V.V. (2002). Cationic lipid-DNA complexes-lipoplexes-for gene transfer and therapy. *Bioelectrochemistry.* 58, 53-46.

Zhu, L., Perez-Alvarado, G. et Wade, R. (1994). Squencing of a cDNA encoding the human fast-twitch skeletal muscle isoform of troponin I. *B.B.A.* 1247, 338-340.

Zhu, N., Liggitt, D., Liu, Y. *et al.* (1993). Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. *Science* 261, 209-211.

Zitvogel, L., Tahara, H., Robbins, P.D. *et al.* (1995). Cancer immunotherapy of established tumors with IL-12. Effective delivery by genetically engineered fibroblasts. *J. Immunol.* 155, 1393-1403.

ANNEXES

Cationic liposomes for tumor imaging and therapy: comparison of organ distribution

A. Werner¹, A. Dutour², U. Michaelis¹, M. Teifel¹, M. Rigaud², B. Sauer¹
¹mbt Munich Biotechnology AG, Fraunhoferstr. 12, 82152 Martinsried, Germany
²Laboratory of Biochemistry and Molecular Genetics, CHU Limoges, France

Introduction

Liposomes have been shown as potent vehicles for therapeutic compounds, like antibiotics or anthracyclines¹. As previously shown cationic liposomes preferentially accumulate in angiogenic endothelial cells of pancreatic tumor vessels in transgenic RIP-Tag2 mice². In this study we investigated whether cationic liposomes maintain their tumor targeting upon loading with diagnostic or therapeutic substances. Here we compared the biodistribution of systemically applied cationic liposomes with and without encapsulation of the anticancer drug paclitaxel.

¹Lasic, D.D (1998) *TIBTECH* 16, 207-211
²Thurston et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103: 1401-13

Materials and Methods

Liposome preparation and analysis:
 The rhodamine-labeled liposomes were prepared by the standard lipid film method using the following lipid mixture:

Prep use	% formulation	Total lipid dose (mg/kg BW)	Rhodamine label (mol/L)	Rhodamine dose (mg/kg BW)	Paclitaxel dose (mg/kg BW)
Imaging	LipoRod	5	5	9.3	-
Therapy	LipoPac-25	25	1	0.3	0.325
	LipoPac-100	100	1	1.2	2.5
	LipoPac-200	200	1	2.4	5

¹BW = body weight

The lipid and rhodamine content were analyzed using HPLC and fluorescence spectroscopy. The size of the liposomes was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) resulting in ~140 nm for LipoRod and ~180 nm for LipoPac.

Animal and tissue treatment:

Experiments were carried out in an orthotopic osteosarcoma model^{3,4}. For tumor induction small pieces of osteosarcoma tumor (size ~8 mm³) were directly grafted under the periosteum of the tibia of male immunocompetent Sprague Dawley rats (21 days old). Three weeks after transplantation the different cationic liposomes were applied by injection into the tail vein. Fifteen minutes later FITC-labeled *Lycopodium obscurum* lectin (5 mg/kg BW) was intravenously applied to counterstain the vascular endothelium. After intracardial perfusion with fixative (1% PFA in PBS) at physiological temperature and pressure, the lung was expanded by instillation of warm low-melting agarose via the trachea. Tissue samples were removed, post-fixed in 1% PFA, cryoprotected in 20% sucrose, frozen and cut into 8-70 µm thick sections. The distribution of liposomes was evaluated by epi-fluorescence microscopy using a Zeiss-Axiophot and standard fluorescence filter sets.

³J.P. Théry et al. (1982) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 378, 209; 1086-1089
⁴Alouche et al. (1980) *Int. J. Cancer* 26: 777-782

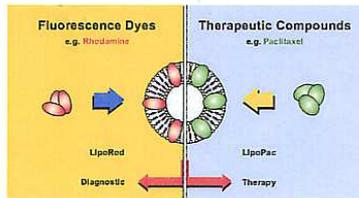


Fig. 1: Cationic liposomes for imaging and therapy. For diagnostic use the LipoRod liposomes are labeled with rhodamine. For therapeutic experiments the cytotoxic compound paclitaxel was encapsulated (LipoPac liposomes). To visualize LipoPac the liposomes were additionally labeled with rhodamine.

Results

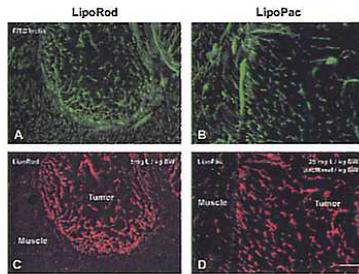


Fig. 2: Distribution of cationic liposomes in the osteosarcoma and the surrounding muscle tissue after systemic application (20 min). A, B The co-injected FITC-labeled lectin serves as a vascular counterstain. C, D Both the diagnostic (LipoRod) and the therapeutic liposomes (LipoPac) show a comparable tissue distribution. They display only weak labeling of the vessels in the muscle. Within tumor tissue both formulations accumulate massively at sites of FITC-labeled endothelial cells of angiogenic vessels. There is apparently no extravascular rhodamine fluorescence. Scale bar A-D: 300 µm.

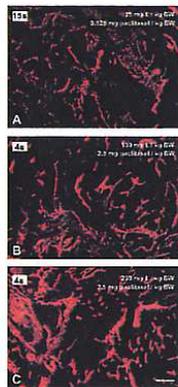


Fig. 3: Dose dependent accumulation of rhodamine-labeled LipoPac in the osteosarcoma. The accumulation of liposomes in the tumor vessels increases dose dependently between 25 and 200 mg lipid/kg BW. The distribution pattern of LipoPac is not affected by the applied dose. Note the longer photographic exposure time for the lowest dose (A; 15s) compared to higher doses (B, C; 4s). Scale bar A-C: 300 µm.



Fig. 4: Selectivity of LipoPac in the osteosarcoma after systemic administration (20 min). The paclitaxel-loaded liposomes (red) show strong labeling of angiogenic tumor vessels, which are counterstained by FITC-labeled lectin (green). The LipoPac liposomes did not bind to the FITC-positive endothelial wall of a non-angiogenic artery (A). Scale bar: 150 µm.

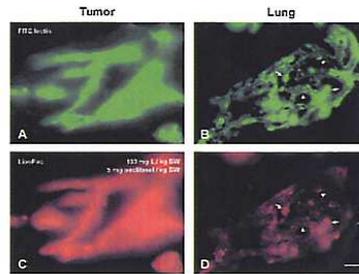


Fig. 5: Paclitaxel-loaded liposomes (LipoPac) in tumor vessels and lung capillaries after intravenous injection (20 min). The co-injected FITC-lectin serves as a vascular label (A, B). C Tumor vessels (green) show a strong and continuous accumulation of LipoPac. D The alveolar capillaries of the lung display minor rhodamine fluorescence (arrowheads), which in part aggregates in coil-like structures (arrows). Scale bar A-D: 30 µm.

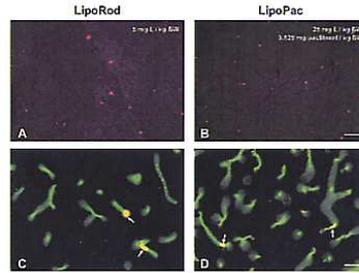


Fig. 6: Rhodamine-labeled LipoPac liposomes in the cortex of the brain after systemic application (20 min). The co-injected FITC-lectin stains the vascular endothelium of the brain capillaries. A, B Both the diagnostic (LipoRod) and the therapeutic (LipoPac) liposomes are almost absent in the brain. C, D They do not bind to the endothelial cells or pass the blood-brain barrier. The rhodamine-labeled liposomes restrictively label single vascular leukocytes (arrows). Scale bar A, B: 150 µm; C, D: 50 µm.

Summary

- Encapsulation of paclitaxel did not interfere with the accumulation of cationic liposomes in tumor blood vessels.
- Strong accumulation of cationic liposomes at neoangiogenic endothelium in the tumor.
- Minor levels of cationic liposomes in muscular tumor environment.
- Low levels of cationic liposomes in alveolar capillaries of the lung.
- No binding of these cationic liposomes in cortical capillaries of the brain.
- No extravasation of liposomes in tumor, lung, brain and muscle tissue.

These cationic liposomes are promising carriers for selective delivery of diagnostic or therapeutic agents to a variety of solid tumors.



www.mbiotech.de

mbt Munich Biotechnology AG



Therapeutic efficacy of endostatin cDNA cationic liposome complexes in a human like orthotopic osteosarcoma model in rats

Dutour A., Monteil J., Paraf F., Kaletta C., Sauer B. and Rigaud M.¹

¹ Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, Faculté de Médecine, Limoges, France
² Service de Médecine nucléaire, Hôpital Universitaire Dupuytren, Limoges, France
³ Service de Radiothérapie, Hôpital Universitaire Dupuytren, Limoges, France
⁴ Leibniz Biotechnology AG, Langerhans, Germany

Introduction

In a human like rat osteosarcoma model, lipid/DNA complexes of cationic DOTAP /Cholesterol (50:50 mol-%) with an endostatin coding plasmid were administered intravenously in the tail vein of the rats. Injections were made three times a week starting at the day when the tumor could be diagnosed by Pet Scan. In a clinical relevant situation, we controlled the progression of the disease and the occurrence of metastases by metabolic and functional imaging by using ¹⁸F-DG tomoscintigraphy. To follow up the tumor vascularisation and the efficiency of antiangiogenic therapy, we used technetium angioscintigraphy.

Materials and methods

Plasmid construction: the murine endostatin cDNA was cloned into pSecTag2 plasmid (Invitrogen). The empty vector pSecTag2 was used as a control plasmid in our experiments. These two constructs were complexed with cationic liposomes. The resulting complexes were: a) lipid/endostatin cDNA complexes and b) lipid/control plasmid complexes.
Animal model and tissue treatment: the animal model has been described by Allouche²³. Tumor transplants were performed on 21-28 days old Sprague Dawley rats according to Allouche's instructions. Endostatin serum level of intravenously treated animals was determined by an ELISA test (Cytimmune) performed according to the manufacturer's instructions. Sections of paraffin embedded animal tissue were stained with Eosin/Hematoxylin/Saffron and observed by

Results



Fig 1: rat osteosarcoma Tumor grown for 14 days without treatment

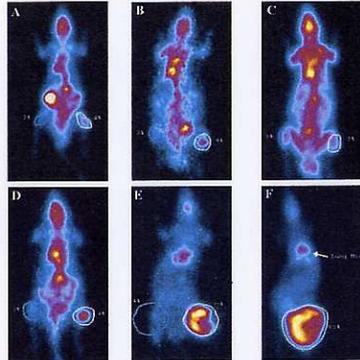


Fig 2: ¹⁸F-DG tomoscintigraphy: in vivo diagnosis and progression of tumor. Pet Scans were performed 3 times during the treatment period. Percent shown on pictures indicate the tumoral and healthy paw uptake of ¹⁸F-DG compared to whole body fixation of the radionuclide. A-C: tumor progression of lipid/endostatin cDNA treated rat. D-F: tumor regression of lipid/control plasmid treated rat. Whereas tumor metabolism of lipid/endostatin complexes treated rat returns to basis metabolism showing tumor total regression, the metabolism of control rat tumor increases dramatically confirming this tumor as hyperproliferative and malignant. In addition, Pet Scan enables the detection of emerging lung metastases in the control rat (Lung Ms: picture F).

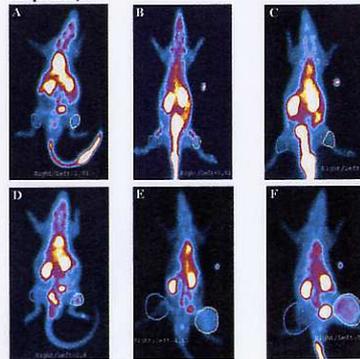


Fig 3: In vivo assessment of tumor vascularization. Angioscintigraphies were performed parallel to Pet Scan after labelling the red cells in vivo with technetium (^{99m}Tc). A, B, C: tumor vascularization of a lipid/endostatin cDNA treated rat. D, E, F: tumor vascularization of a lipid/control plasmid treated rat. The quotient Right/Left is the ratio between fixation of ^{99m}Tc by the tumor and the same area of the healthy paw. A return to normal vascular density is observed for the tumor of lipid/endostatin treated rat (pictures A-C) and correlated to tumor regression as shown by Pet Scan. An increase in tumor vascularisation in the control group (pictures D-F) is noted corresponding to tumor exponential growth as confirmed by Pet Scan.

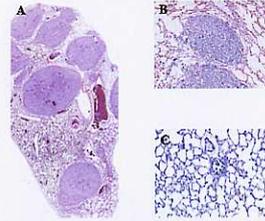


Fig 4: Lung morphology at the end of the therapy. A and B: lung of a control rat. A: global view of the lung where seven metastases can be depicted. B: detail of lung metastases (x 50). Histology of metastases is identical to the one of the primary tumor. C: Lung of a lipid/endostatin complexes treated rat (x50). Histological structures of the lung are preserved. No metastases can be detected neither macroscopically nor microscopically.

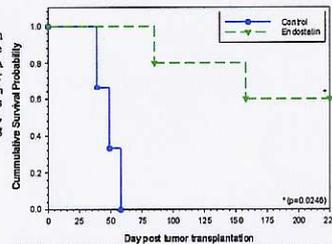


Fig 5: Survival analysis of intravenously treated animals (Kaplan Meier analysis). At the beginning of the treatment endostatin treated group (green line) included 5 animals, control group 3 (blue line). Efficiency of endostatin gene therapy is demonstrated by statistical analysis (Mantel-Cox test: p=0,0246).

Conclusion

Significant increase of survival time of endostatin treated animals

Tumor regression or at least decrease in the tumor growth rate in endostatin treated animals

Complete prevention of lung metastases in endostatin treated animals

No increase of endostatin serum levels after iv. injections of lipid/endostatin complexes (data not shown)

References
 1) Dutour A., Alameda M., Paraf F. et al. (2002) Un modèle rat orthotopique d'ostéosarcome humain. *Ann. Exp. Pathol.*, 28: 164-167.
 2) Allouche C., Alameda M., Paraf F. et al. (2002) Un modèle rat orthotopique d'ostéosarcome humain. *Ann. Exp. Pathol.*, 28: 164-167.
 3) Allouche C., Alameda M., Paraf F. et al. (2002) Un modèle rat orthotopique d'ostéosarcome humain. *Ann. Exp. Pathol.*, 28: 164-167.

Communication réalisée au GETO (Octobre 2003)

Essai de thérapie génique antiangiogénique sur l'ostéosarcome greffable de rat par administration intraveineuse du gène de l'endostatine.

A. DUTOUR, F. FIORENZA, H. CHABLE, J. MONTEIL, K. NAUJOKS*,
JL. CHARISSOUX, M. RIGAUD
CHU DUPUYTREN, LIMOGES, France
MUNICH BIOTECH AG, MUNICH, Allemagne*

Introduction : L' endostatine est une protéine de 20 kDa issu du fragment C-terminal du collagène 18. C' est un inhibiteur spécifique de la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et un inhibiteur de l'angiogénèse et de la croissance tumorale *in vivo*. Les liposomes sont des vecteurs non viraux donc sans risques, utilisables pour le transfert de gènes *in vivo*.

But de l'étude: démontrer l'efficacité thérapeutique d'une nouvelle méthode de thérapie génique antiangiogénique utilisant un complexe liposome- ADNc endostatine (lipoplexe endostatine) dans le traitement de l'ostéosarcome expérimental de rat.

Méthodes : Les tumeurs étaient greffées sur des rats Sprague Dawley de 3 semaines en position paratibiale après avivement du périoste. Après 10 jours, les rats dont les tumeurs étaient détectables cliniquement étaient évaluées au PET- SCAN (¹⁸FDG) et répartis en 2 groupes : un groupe témoin et un groupe traité par l'endostatine. Le traitement était administré par voie intraveineuse tous les deux jours pendant 4 semaines (240 µg d'ADNc endostatine). La réponse au traitement a été évalué selon plusieurs critères : contrôle local (volume tumoral), recherche des métastases, étude de la survie. Un suivi par imagerie au PET-Scan a été réalisé ainsi qu'une analyse anatomopathologique systématique.

Résultats : Il existait un meilleur contrôle local de la tumeur pour le groupe traité par l'endostatine ($p < 0,05$) avec dans certains cas une régression spectaculaire des tumeurs. Ce groupe constituait les survivants à long terme comparé au groupe témoin où la mortalité était de 100% ($p < 0,05$). L' étude au PET Scan montrait une activité métabolique réduite au niveau des tumeurs traitées. A l'étude anatomopathologique finale, on notait une absence de métastases ou de micrométastases pulmonaires pour le groupe traité par l'endostatine contre 80% de survenue de métastases pulmonaires pour le groupe témoin.

Conclusion : Ces résultats préliminaires montrent que le complexe liposome - ADNc endostatine constitue une alternative efficace dans le traitement de l'ostéosarcome greffable de rat. Ces résultats prometteurs posent la question de l'utilisation de cette méthode de thérapie génique antiangiogénique comme traitement adjuvant sur l'ostéosarcome humain.

Communication effectuée au CTOS (Novembre 2003)

TREATMENT OF EXPERIMENTAL OSTEOSARCOMA IN RATS USING CDNA ENDOSTATIN CATIONIC LIPOSOME COMPLEXES

A. Dutour, F. Fiorenza, H. Chable, J. Monteil, C Kaletta, J.L. Charissoux, K. Naujoks ,M. Rigaud

Dupuytren Teaching Hospital, Limoges, France

Munich Biotech AG, Munich, Germany

Purpose :

The authors demonstrate the therapeutic capacity of the endostatin DNA complexed to cationic liposomes on a rat osteosarcoma model in rats.

Background data:

Endostatin is an angiogenesis inhibitor produced by hemangioendothelioma. It is a 20 kDa C-terminal fragment of collagen XVIII. Endostatin specifically inhibits endothelial proliferation and potently inhibits angiogenesis and tumour growth. Liposomes-DNA complexes are non viral vectors that can be used for in vivo transfer of cDNA endostatin gene.

Methods:

Tumours were generated by grafting 5-6 mm³ of fresh tumour tissue at the medial surface of the shin bone of Sprague dawley rats. After 10 days, rats with osteosarcoma were distributed in 2 groups of 6 rats chosen in an unpredictable way. Rats from group 1 received intravenous injections three times a week for 4 weeks of 1,2 ml solution of cationic liposomes (DOTAP:Chol) bearing the pSecTag 2/endostatin gene (240 µg of cDNA) . Rats from group 2 received an injection of the same solution without the endostatin gene. Clinical response to treatment was assessed by tumour volume evaluation, rate of metastasis, survival, positon emission tomography studies and histologic analysis of tumour and lung sections.

Results

The endostatin group was compared to the control one and clearly showed a better survival rate at 5 weeks with no death ($p < 0.05$), complete inhibition or slow development of tumour volume and decreased pet scan radioactivity integration regarding tumour evolution. In particular, there was no lung metastasis for the endostatin group compared to 80% for the control group .

Conclusions:

These preliminary results indicate that a liposome DNA vector containing the endostatin cDNA gene is effective in treating established osteosarcoma in these short animal series.. It raises the possibility of using this method of antiangiogenic gene therapy eventually for clinical trials for patients with osteosarcoma . It could represent a good adjuvant therapy when associated to standard protocols for these patients.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	11
INTRODUCTION.....	18
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	21
I. THÉRAPIE GÉNIQUE DU CANCER.....	22
I – 1. GÉNÉRALITÉS	22
I – 2. MÉTHODES DE TRANSFERT DES GÈNES	23
I – 2 – 1. Vecteurs de transfert viraux	23
I – 2 – 1 – 1. Principe des vecteurs viraux	23
I – 2 – 1 – 2. Vecteurs rétroviraux.....	27
I – 2 – 1 – 3. Vecteurs adénoviraux.....	28
I – 2 – 1 – 4. « adeno associated virus » (AAV)	30
I – 2 – 2. Vecteurs de transfert non viraux	30
I – 2 – 2 – 1. ADN nu	32
I – 2 – 2 – 2. Electroporation.....	32
I – 2 – 2 – 3. Liposomes	33
I – 2 – 2 – 4. Liposomes cationiques.....	34
I – 2 – 2 – 4 – 1. Formation des complexes liposomes cationiques/ADN	34
I – 2 – 2 – 4 – 2. Mécanisme de transfection	37
I – 2 – 2 – 4 – 3. Liposomes cationiques et ciblage cellulaire	38
I – 3. STRATÉGIES DE THÉRAPIE GÉNIQUE APPLIQUÉES AU TRAITEMENT DU CANCER.....	42
I – 3 – 1. Gènes de sensibilité à une prodrogue ou gènes suicides.....	42
I – 3 – 2. Modification de la fonction des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur	45
I – 3 – 2 – 1. Inhibition de l'expression des oncogènes	45
I – 3 – 2 – 2. Rétablissement des gènes suppresseurs de tumeur	45
I – 3 – 3. Immunothérapie	46
I – 3 – 3 – 1. Immunothérapie adoptive	46
I – 3 – 3 – 2. Immunothérapie active.....	47
I – 3 – 4. Augmentation de la résistance des tissus sains vis à vis de la chimiothérapie .	48
I – 3 – 5. Thérapie génique antiangiogénique.	49
II. OSTÉOSARCOME.....	50
II – 1. DÉFINITION.....	50
II – 2. DIAGNOSTIC	50
II – 2 – 1. Présentation clinique.....	50
II – 2 – 2. Imagerie médicale.....	51
II – 2 – 2 – 1. Radiologie.....	51
II – 2 – 2 – 2. Scintigraphie	51
II – 2 – 3. Anatomopathologie de l'ostéosarcome	53
II – 3. TRAITEMENT CONVENTIONNEL DE L'OSTÉOSARCOME	53
II – 4. EVOLUTION DE LA CHIMIOTHÉRAPIE DE L'OSTÉOSARCOME	56
II – 5. FACTEURS PRONOSTICS DE L'OSTÉOSARCOME	56

II - 6. NOUVELLES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES APPLICABLES AU TRAITEMENT DE L'OSTÉOSARCOME	58
II - 6 - 1. Système gène suicide/prodrogue et ostéosarcome.....	58
II - 6 - 2. Thérapie antiangiogénique de l'ostéosarcome	59

III. ANGIOGÈNE TUMORALE ET THÉRAPIES ANTIANGIOGÉNIQUES..... 61

III - 1. DÉFINITION	61
III - 2. DÉROULEMENT DE L' ANGIOGÈNE TUMORALE	61
III - 2 - 1. Initiation de la réponse angiogénique.....	62
III - 2 - 2. Activation des cellules endothéliales	63
III - 2 - 3. Migration et prolifération des cellules endothéliales	63
III - 2 - 4. Formation et stabilisation des nouveaux vaisseaux.....	64
III - 2 - 5. Caractéristiques des vaisseaux tumoraux.....	64
III - 3. STRATÉGIES ANTIANGIOGÉNIQUES	65
III - 3 - 1. Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales.....	65
III - 3 - 1 - 1. Neutralisation des facteurs pro-angiogéniques	65
III - 3 - 1 - 2. Inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales	66
III - 3 - 2. Inhibition de la migration des cellules endothéliales	68
III - 3 - 2 - 1. Inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire	69
III - 3 - 2 - 2. Inhibition de l'interaction des cellules endothéliales à la MEC.....	69
III - 3 - 4. Inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse.....	72
III - 3 - 4 - 1. Angiostatine	72
III - 3 - 4 - 2. Endostatine	73
III - 3 - 4 - 3. Troponine I musculaire	76
III - 3 - 5. Thérapie génique antiangiogénique	78
III - 3 - 5 - 1. Inhibition des facteurs proangiogéniques.....	79
III - 3 - 5 - 2. Augmentation des facteurs proangiogéniques.....	79

MATERIEL ET MÉTHODES

I. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLIQUÉES À LA CONSTRUCTION DU PLASMIDE RECOMBINANT PSECTNITAG

I - 1. EXTRACTION DES ARN TOTAUX.....	86
I - 2. TRANSCRIPTION INVERSE (RT)	86
I - 3. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE OU PCR	87
I - 4. QUANTIFICATION DES ACIDES NUCLÉIQUES EN SPECTROPHOTOMÉTRIE	89
I - 5. ELECTROPHORÈSE EN GEL D'AGAROSE.....	89
I - 6. CONSTRUCTION DU PLASMIDE PSECTNITAG	90
I - 6 - 1. Plasmide pSecTag2C	90
I - 6 - 2. Clonage de l'ADNc de la TnI dans le plasmide : méthode « DiTriSec ».....	91
I - 6 - 2 - 1. Préparation du plasmide et du produit de PCR.....	91
I - 6 - 2 - 1 - 1. Linéarisation du plasmide	91
I - 6 - 2 - 1 - 2. Modification du produit de PCR.....	91
I - 6 - 2 - 2. Ligation	93
I - 7. AMPLIFICATION DES PLASMIDES RECOMBINANTS	94
I - 7 - 1. Transformation bactérienne	94

I – 7 – 2. Amplification et extraction d'ADN plasmidique.....	95
I – 7 – 2-1. Minipréparation.....	95
I – 7 – 2 – 2. Maxipréparation et gigapréparation.....	95
II. CULTURE CELLULAIRE.....	96
II – 1. CULTURE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE D'OSTÉOSARCOME 1547.....	96
II – 2. CULTURE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE ENDOTHÉLIALE BOVINE (EJG).....	97
II – 3. CULTURE DE LA LIGNÉE CELLULAIRE HUMAINE HUVEC	97
II – 4. COCULTURE VERTICALE DE CELLULES 1547 ET EJG	97
II – 5. COURBES DE CROISSANCE.....	100
II – 6. COURBES DE CYTOTOXICITÉ	100
III. TRANSFECTION DES CELLULES	101
III – 1. ELECTROPORATION.....	101
III – 1 – 1. Préparation des constructions plamidiques	101
III – 1 – 2. Transfection par électroporation	102
III – 1 – 3. Isolement de clones cellulaires.....	102
III – 1 – 4. Vérification de l'intégration des plasmides	103
II – 1 – 4 – 1. Extraction de l'ADN génomique.....	103
II – 1 – 4 – 2. Réaction de polymérisation en chaîne ou PCR	103
III – 2. TRANSFECTION PAR FUGENE 6.....	105
III - 3. TRANSFECTION PAR LES COMPLEXES LIPOSOMES CATIONIQUES/ADNC	106
III – 3 – 1. Préparation des lipoplexes.....	106
III – 3 – 2. Transfection par les lipoplexes.....	107
IV. TECHNIQUES DE DÉTECTION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES	107
IV – 1. WESTERN BLOT	107
IV – 1 – 1. Migration des protéines en SDS-PAGE.....	107
IV – 1 – 1 – 1. Préparation des échantillons.....	107
IV – 1 – 1 – 2. Electrophorèse.....	108
IV – 1 – 2. Technique du Western blot	108
IV – 1 – 2 – 1. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	108
IV – 1 – 2 – 2. Incubation avec les anticorps	109
IV – 1 – 2 – 3. Réaction de chimioluminescence.....	109
IV – 2. DÉTECTION IN SITU DES PROTÉINES PAR IMMUNOFLUORESCENCE	110
V. DÉTECTION DE L'APOPTOSE CELLULAIRE	111
V – 1. ANALYSE DES MODIFICATIONS DE MORPHOLOGIE CELLULAIRE	111
V – 2. DOUBLE COLORATION NUCLÉAIRE DAPI ET T.U.N.E.L.....	111
VI. ESSAI DE THÉRAPIE GÉNÉRIQUE CHEZ DES RATS PORTEURS D'OSTÉOSARCOME	112
VI – 1. OSTÉOSARCOME GREFFABLE DU RAT.....	112
VI – 2. GREFFE TUMORALE.....	113
VI – 2 – 1. Préparation des fragments tumoraux.....	113
VI – 2 – 2. La greffe	113
VI – 3. DIAGNOSTIC ET SUIVI.....	114
VI – 3 – 1. Examen clinique.....	114
VI – 3 – 2. Imagerie médicale	115

VI – 3 – 2 – 1. Tomoscintigraphie au ¹⁸ FDG	115
VI – 3 – 2 – 1. Principe	115
VI – 3 – 2 – 2. Déroulement de l'examen	115
VI – 3 – 2 – 2. Angioscintigraphie au ^{99m} Tc	116
VI – 3 – 2 – 2 – 1. Principe	116
VI – 3 – 2 – 2 – 2. Déroulement de l'examen	116
VI – 4. DÉTECTION DE LA DISTRIBUTION DES LIPOSOMES EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	117
VI – 5. DIFFÉRENTS TRAITEMENTS APPLIQUÉS	118
VI – 5 – 1. Traitement intratumoral	119
VI – 5 – 2. Traitement intraveineux	119
VI – 6. MÉTHODES D'HISTOLOGIE	122
VI – 6 – 1. Analyse histologique de la tumeur et des poumons	122
VI – 6 – 2. Analyse de la vascularisation et de l'apoptose tumorale	122
VII – 6 – 2 – 1. Fixation et cryoconservation des organes	122
VI – 6 – 2 – 2. Détection des vaisseaux tumoraux en immunofluorescence	123
VI – 6 – 2 – 3. Détection simultanée de la vascularisation et de l'apoptose tumorales	123
VI – 7. DOSAGE DE L'ENDOSTATINE CIRCULANTE APRÈS INJECTION INTRA VEINEUSE DES LIPOPLEXES	124

RESULTATS 126

I. CONSTRUCTION DU PLASMIDE PSECTNITAG 129

I – 1. ISOLATION DE LA SÉQUENCE CODANTE DE LA TNI	129
I – 2. CLONAGE DE LA SÉQUENCE CODANTE DE LA TNI DANS LE PLASMIDE PSECTAG2C	131
I – 3. VÉRIFICATION DE LA CONSTRUCTION PLASMIDIQUE PSECTNITAG	133

II. VÉRIFICATION DE LA FONCTIONNALITÉ DES PLASMIDES

RECOMBINANTS 135

II – 2. EVALUATION DES CONSTRUCTIONS PLASMIDIQUES	135
II – 2 – 1. Expression des protéines recombinantes par les cellules 1547	135
II – 2 – 1 – 1. Vérification de l'intégration des plasmides	135
II – 2 – 1 – 1 – 1. Intégration du plasmide pSecTnITag	135
II – 2 – 1 – 1 – 2. Plasmide pSecEndo	137
II – 2 – 1 – 2. Détection de l'expression des protéines recombinantes	138
II – 2 – 1 – 2 – 1. Détection par Western Blot	138
II – 2 – 1 – 2 – 1 – a. Détection de la protéine TnITag	138
II – 2 – 1 – 2 – 1 – b. Détection de la protéine SecEndo	140
II – 2 – 1 – 2 – 2. Détection en immunohistochimie	141
II – 2 – 2. Expression des protéines recombinantes par les cellules EJG	144
II – 3. EVALUATION DE L'ACTIVITÉ ANTIANGIOGÉNIQUE DE LA PROTÉINE SÉCRÉTÉE	146
II – 3 – 1. Coculture verticale de cellules EJG et 1547/pSecEndo	148
II – 3 – 2. Coculture verticale des cellules EJG et de la sous lignée 1547/pSecTnITag	149

III. EFFETS DE LA TRANSFECTION DES ADNC DE L'ENDOSTATINE ET DE LA TNI SUR LES MODÈLES CELLULAIRES.....	151
III – 1. CARACTÉRISTIQUES DES LIGNÉES CELLULAIRES UTILISÉES	152
III – 1 – 1. Lignée de cellules d'ostéosarcome.....	152
III – 1 – 2. Lignée de cellules endothéliales capillaires	152
III – 1 – 2 – 1. Prolifération des cellules EJG	153
III – 1 – 2 – 2. Morphologie des cellules EJG.....	154
III – 2. TRANSFECTION PAR LES LIPOSOMES CATIONIQUES: ÉTUDE DE L'INCORPORATION DES LIPOSOMES PAR LES CELLULES EN CULTURE	156
III – 3. EFFET DES ADNC DE L'ENDOSTATINE ET DE LA TNI SUR LES CELLULES 1547.....	158
III – 4. EFFET DES DES ADNC DE L'ENDOSTATINE ET DE LA TNI SUR LES CELLULES EJG.	162
III – 4 – 1. ADNc et croissance cellulaire	162
III – 4 – 2. Détection de l'apoptose des cellules EJG après transfection par les lipoplexes/pSecEndo et pSecTnI.....	167
III – 4 – 2 – 1. Morphologie des cellules après transfection	167
III – 4 – 2 – 2. Détection de l'apoptose des cellules après transfection.....	169
IV. ADMINISTRATION DES LIPOPLEXES AUX RATS PORTEURS D'OSTÉOSARCOME	171
IV – 1. ADMINISTRATION INTRATUMORALE DES LIPOPLEXES/PSECENDO.....	172
IV – 2. EFFETS DES LIPOPLEXES ADMINISTRÉS PAR VOIE INTRA VEINEUSE.....	182
IV – 2 – 1. Biodistribution des liposomes cationiques.....	182
IV – 2 – 2. Comparaison des effets des ADNc de l'endostatine et de la TnI.....	186
IV – 2 – 2 – 1. Effet des gènes antiangiogéniques sur la croissance tumorale	186
IV – 2 – 2 – 2. Effet des gènes antiangiogéniques sur la vascularisation tumorale ..	188
IV – 2 – 2 – 3. gènes antiangiogéniques et apoptose tumorale	190
IV – 2 – 2 – 3 – 1. Apoptose des cellules tumorales	190
IV – 2 – 2 – 3 – 2. Apoptose des cellules endothéliales.....	192
IV – 3. EFFET DE L'ADMINISTRATION DES LIPOPLEXES/PSECENDO PAR VOIE INTRA VEINEUSE	192
IV – 3– 1 Evolution tumorale.....	193
IV – 3 – 1 - 1 Groupe témoin	193
IV – 3 – 1 – 2. Groupe Lipoplexe/pSecEndo	195
IV – 3– 2. Analyses histologiques des tumeurs et des poumons en fin de traitement par les lipoplexes/pSecEndo.....	200
IV – 3– 3. Dosage de l'endostatine circulante	204
DISCUSSION	208
I. EFFET DES GÈNES UTILISÉS <i>IN VITRO</i> SUR DES MODÈLES DE CULTURE CELLULAIRE.	210
II. POURQUOI L'ADNC DE TNI N'ENTRAÎNE <i>IN VIVO</i> NI RETARD DE LA CROISSANCE TUMORALE NI MODIFICATION DE LA VASCULARISATION ?	213

III. L'ADNC DE L'ENDOSTATINE PRÉVIENT LA DISSÉMINATION MÉTASTATIQUE ET ENTRAÎNE UN RETARD DE CROISSANCE TUMORALE <i>IN VIVO</i>	215
IV. L'ADNC DE L'ENDOSTATINE INDUIT <i>IN VIVO</i> UNE DIMINUTION DE LA VASCULARISATION TUMORALE	220
V. LES LIPOSOMES CATIONIQUES ADMINISTRÉS PAR VOIE INTRAVEINEUSE PERMETTENT UN CIBLAGE TUMORAL DES ADNC	223
VI. APPORT DE L'IMAGERIE MÉDICALE DANS LE SUIVI DU TRAITEMENT ANTIANGIOGÉNIQUE.....	224
CONCLUSION	226
BIBLIOGRAPHIE	228
ANNEXES.....	246
TABLE DES MATIÈRES.....	251
LISTE DES TABLEAUX.....	258
LISTE DES FIGURE S.....	260

LISTE DES TABLEAUX

Tableau B1 : Caractéristiques des principaux vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gènes	26
Tableau B2 : caractéristiques des principaux vecteurs non viraux utilisés dans les essais de thérapie génique.	31
Tableau B3 : Exemples de ciblage tissulaire obtenu par greffage d'anticorps sur des liposomes.....	40
Tableau B4 : Récapitulatif des principaux vecteurs utilisés pour des essais cliniques de thérapie génique.	41
Tableau B5 : quelques protocoles thérapeutiques appliqués au traitement de l'ostéosarcome	55
Tableau B6 : Principaux facteurs pronostiques de l'ostéosarcome	57
Tableau B7 : Quelques essais cliniques de thérapie antiangiogénique en cours en juillet 2003.	71
Tableau B8 : Quelques exemples de thérapie génique antiangiogénique visant à inhiber les stimuli pro-angiogénique.....	81
Tableau B8 (suite) : Quelques exemples de thérapie génique antiangiogénique visant à augmenter les agents anti-angiogéniques	82
Tableau M1 : Programme PCR pour amplification de la séquence codante TnI.	88
Tableau M2 : Composition du mélange réactionnel de ligation	93
Tableau M3 : récapitulatif des amorces PCR utilisées pour les vérifications de l'intégration des constructions plasmidiques.	104
Tableau M4 : Récapitulatif des programmes PCR utilisés pour amplifier les différents fragments.	104
Tableau M5: Récapitulatif des traitements et de leur durée d'application.....	121
Tableau R1 : Inhibition de croissance des cellules endothéliales 36 h après leur transfection par les lipoplexes.	166

LISTE DES FIGURES

Figure B1 : Principe de la transfection utilisant les vecteurs viraux.....	24
Figure B2 : Formation des lipoplexes.	36
Figure B3 : Représentation schématique du mécanisme de transfert des lipoplexes dans la cellule.	37
Figure B4 : Schéma du mécanisme d'action du système gène suicide/prodrogue	43
Figure B5 : Déroulement de l'angiogenèse tumorale (d'après Kalluri, 2003).....	62
Figure B6 : Cibles moléculaires et principaux agents inhibiteurs de la prolifération des cellules endothéliales	67
Figure B7 : Cibles moléculaires et principaux agents inhibiteurs de la migration des cellules endothéliales	68
Figure B8 : Mécanisme de libération de l'endostatine à partir du collagène XVIII.	74
Figure B9 : Rôle de la TnI dans la contraction musculaire	76
Figure M1 : Schéma du plasmide pSecTag2 (Invitrogen)	90
Figure M2 : Schéma du protocole « DiTriSec »	92
Figure M3 : Principe de la coculture verticale.	99
Figure M4 : Etude de la biodistribution des liposomes cationiques après injection par voie intraveineuse.....	118
Figure M5 : Administration des lipoplexes par voie intraveineuse et suivi par imagerie médicale : déroulement de l'essai.	120
Figure R1 : Analyse des produits amplifiés par RT-PCR réalisée à partir des ARN totaux extraits de muscle squelettique humain.....	130
Figure R2 : Profil de digestion par l'enzyme de restriction <i>PvuII</i> des produits de RT-PCR.	131
Figure R3 : Profil de digestion des clones bactériens obtenus après transformation avec le produit de ligation pSecTnITag.....	132
Figure R4 : Séquençage du plasmide pSecTnITag.	134
Figure R5 : Analyse par PCR de l'intégration du plasmide pSecTnITag dans les cellules 1547 électroporées.....	136
Figure R6 : Analyse par PCR de l'intégration du plasmide pSecEndo dans les cellules 1547 électroporées.....	137
Figure R7 : Détection de l'expression de la TnI par Western blot.....	139
Figure R8: Détection de l'expression de l'endostatine par Western blot.....	140

Figure R9 : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules 1547.....	142
Figure R9 (suite) : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules 1547.....	143
Figure R10 : Immunodétection en microscopie de fluorescence des protéines recombinantes dans les cellules EJG.....	145
Figure R11: Courbes de la croissance comparative des cellules EJG, 1547 parentales, 1547pSecTag, 1547 pSecTnITag, 1547 pSecEndo.	147
Figure R12 : Courbes de croissance comparative des cellules EJG en co-culture avec les cellules 1547/pSecEndo.	149
Figure R13 : Courbes de croissance comparative des cellules EJG en coculture avec les cellules 1547/pSecTnITag.....	150
Figure R14 : Courbes de croissance comparatives des cellules EJG parentales et stimulées par des concentrations croissantes de b-FGF.	153
Figure R15 : Morphologie des cellules EJG	155
Figure R16 : Incorporation des liposomes marqués par la rhodamine en microscopie de fluorescence.....	157
Figure R17 : Courbes de croissance comparative des cellules 1547 parentales et transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.	159
Figure R17 (suite) : Courbes de croissance comparative des cellules 1547 parentales et transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.	160
Figure R18 : courbes de croissance comparative des cellules EJG transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.	163
Figure R18 (suite) : courbes de croissance comparative des cellules EJG transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.....	164
Figure R19 : Courbes de croissance comparatives des cellules HUVEC transfectées à l'aide des liposomes et lipoplexes pSecTag, pSecEndo, pSecTnITag.....	165
Figure R20 : Morphologie des cellules EJG 18 h après la transfection par les lipoplexes. ...	168
Figure R21 : Observation en microscopie de fluorescence après coloration nucléaire des cellules EJG par double marquage T.U.N.E.L./DAPI.	170
Figure R22 : Evolution des volumes tumoraux au cours du traitement.....	174
Figure R23 : Analyse histologique d'une tumeur ayant totalement régressée.....	175
Figure R24 : Analyses histologiques de poumon de rat témoin.....	177
Figure R25 : Coupe de poumon réalisée sur un rat traité par les lipoplexes/pSecEndo	178

Figure R26 : Coupes histologiques d'une tumeur provenant d'un rat témoin	180
Figure R27 : Coupe histologique d'une tumeur provenant d'un rat traité par les lipoplexes/pSecEndo	181
Figure R28 : Biodistribution des liposomes cationiques.....	184
Figure R28 (suite) : Biodistribution des liposomes cationiques.	185
Figure R29 : Evolution des volumes tumoraux moyens en cours de traitement.....	187
Figure R30 : Analyse de la vascularisation tumorale par microscopie de fluorescence.	189
Figure R31 : Détection de l'apoptose des cellules endothéliales et tumorales par microscopie de fluorescence.....	191
Figure R32 : Evolution de la fixation du ^{18}F FDG au cours du traitement : rat témoin.....	194
Figure R33 : Evolution parallèle de la fixation tumorale de ^{18}F FDG et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ au cours du traitement lipoplexe/pSecEndo.	196
Figure R34 : Fixation de ^{18}F FDG et $^{99\text{m}}\text{Tc}$ au cours du traitement chez un rat échappant au traitement lipoplexe/pSecEndo.	197
Figure R35 : évolution des volumes tumoraux en cours de traitement.....	198
Figure R36 : Analyses histologiques des poumons en fin de traitement par les lipoplexes contrôles et pSecEndo.	201
Figure R37 : Analyses histologiques des tumeurs en fin de traitement par les lipoplexes contrôle et pSecEndo.....	203
Figure R38 : Dosage E.I.A de l'endostatine plasmatique.	204
Figure R39 : Analyse de la survie des animaux traités par voie intraveineuse.....	207