

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science - Technologie - Santé

Faculté de Médecine

Année 2004/2005

Thèse N°

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie Moléculaire

présentée et soutenue publiquement par

Dany LECLERS

le 18 octobre 2005

Conception de récepteurs circulants anti-lymphangiogéniques par
clonage de la séquence codante du gène humain VEGFR-3
Application en cancérologie

JURY :

Mr le Professeur Raphael ROUSSEAU

Rapporteur

Mr le Professeur Thomas BACHELOT

Rapporteur

Mr le Professeur Michel RIGAUD

Examineur

Mr le Professeur Jean Louis CHARISSOUX

Examineur

Mr le Docteur Jacques MONTEIL

Examineur

Mlle le Docteur Aurélie DUTOUR

Examineur

UNIVERSITE DE LIMOGES
FACULTE DE MEDECINE

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur VANDROUX Jean-Claude

ASSESSEURS : Monsieur le Professeur LASKAR Marc
Monsieur le Professeur VALLEIX Denis
Monsieur le Professeur COGNE Michel

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE – CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS :

ROCHE Doriane

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS :

C.S. : Chef de Service

ACHARD Jean-Michel	PHYSIOLOGIE
ADENIS Jean-Paul (C.S.)	OPHTALMOLOGIE
ALAIN Jean-Luc (C.S.)	CHIRURGIE INFANTILE
ALDIGIER Jean-Claude (C.S.)	NEPHROLOGIE
ARCHAMBEAUD-MOUVEROUX Françoise (C.S.)	MEDECINE INTERNE
ARNAUD Jean-Paul (C.S.)	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
AUBARD Yves (C.S.)	GYNECOLOGIE - OBSTETRIQUE
BEDANE Christophe	DERMATOLOGIE
BERTIN Philippe	THERAPEUTIQUE
BESSEDE Jean-Pierre	OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BONNAUD François (C.S.)	PNEUMOLOGIE
BONNETBLANC Jean-Marie	DERMATOLOGIE
BORDESSOULE Dominique (C.S.)	HEMATOLOGIE
CHAPOT René	RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE
CHARISSOUX Jean-Louis	CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
CLAVERE Pierre (C.S.)	RADIOTHERAPIE
CLEMENT Jean-Pierre (C.S.)	PSYCHIATRIE
COGNE Michel (C.S.)	IMMUNOLOGIE

COLOMBO Pierre
CORNU Elisabeth
COURATIER Philippe
CUBERTAFOND Pierre
DANTOINE Thierry
DARDE Marie-Laure (C.S.)
DE LUMLEY WOODYEAR Lionel (C.S.)
DENIS François (C.S.)
DESCOTTES Bernard (C.S.)
DUDOGNON Pierre (C.S.)
DUMAS Jean-Philippe (C.S.)
DUMONT Daniel (C.S.)
FEISS Pierre (C.S.)
FEUILLARD Jean (C.S.)
GAINANT Alain (C.S.)
GAROUX Roger (C.S.)
GASTINNE Hervé (C.S.)
JAUBERTEAU-MARCHAN Marie-Odile
LABROUSSE François (C.S.)
LACROIX Philippe
LASKAR Marc (C.S.)
LE MEUR Yannick
LIENHART-ROUSSIE Anne
MABIT Christian
MARQUET Pierre
MAUBON Antoine (C.S.)
MELLONI Boris
MERLE Louis
MOREAU Jean-Jacques (C.S.)
MOULIES Dominique (C.S.)
NATHAN-DENISOT Nathalie
PARAF François
PILLEGAND Bernard
PIVA Claude (C.S.)
PLO Y Marie-Cecile
PREUX Pierre-Marie
RIGAUD Michel (C.S.)

UROLOGIE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
NEUROLOGIE
CLINIQUE DE CHIRURGIE DIGESTIVE
GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT
PARASITOLOGIE
PEDIATRIE
BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
ANATOMIE
REEDUCATION FONCTIONNELLE
UROLOGIE
MEDECINE DU TRAVAIL
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
HEMATOLOGIE
CHIRURGIE DIGESTIVE
PEDOPSYCHIATRIE
REANIMATION MEDICALE
IMMUNOLOGIE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
MEDECINE VASCULAIRE
CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIO-VASCULAIRE
NEPHROLOGIE
PEDIATRIE
ANATOMIE CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE
PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE
RADIOLOGIE
PNEUMOLOGIE
PHARMACOLOGIE
NEUROCHIRURGIE
CHIRURGIE INFANTILE
ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE
ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUE
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
MEDECINE LEGALE - HEMATOLOGIE
BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE
INFORMATION MEDICALE ET EVALUATION
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

SALLE Jean-Yves
SAUTEREAU Denis (C.S.)
SAUVAGE Jean-Pierre (C.S.)
STURTZ Franck
TEISSIER-CLEMENT Marie-Pierre
TREVES Richard (C.S.)
TUBIANA-MATHIEU Nicole (C.S.)
VALLAT Jean-Michel (C.S.)
VALLEIX Denis
VANDROUX Jean-Claude (C.S.)
VERGNENEGRE Alain (C.S.)
VIDAL Elisabeth (C.S.)
VIGNON Philippe
VIROT Patrice (C.S.)
WEINBRECK Pierre (C.S.)
YARDIN Catherine (C.S.)

MEDECINE PHYSIQUE ET READAPTATION
HEPATO-GASTRO-ENTEROLOGIE
OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE
BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
ENDOCRINOLOGIE ET MALADIES METABOLIQUES
RHUMATOLOGIE
CANCEROLOGIE
NEUROLOGIE
ANATOMIE – CHIRURGIE GENERALE
BIOPHYSIQUE ET TRAITEMENT DE L'IMAGE
EPIDEMIOLOGIE-ECONOMIE DE LA SANTE
MEDECINE INTERNE
REANIMATION MEDICALE
CARDIOLOGIE
MALADIES INFECTIEUSES
HISTOLOGIE-CYTOLOGIE-CYTOGENETIQUE

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS :

BUCHON Daniel
BUISSON Jean-Gabriel

MEDECINE GENERALE
MEDECINE GENERALE

*A mon père,
Que ce travail soit un témoignage de mon immense affection, de
mon respect au regard de ses formidables qualités et de mon
infinie reconnaissance pour ce qu'il m'a appris et donné.
Que notre complicité d'autrefois demeure à jamais gravée
auprès de mes meilleurs souvenirs...*

A ma mère, à son courage et son extraordinaire dévouement,

A mon frère et son exemplarité absolue,

A ma famille,

A tous mes amis.

Remerciements

Monsieur le Professeur Michel RIGAUD,

Professeur des Universités de Biochimie et de Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de Limoges,

Biologiste des Hôpitaux, Chef du Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimie des Explorations Fonctionnelles, C.H.R.U. de Limoges,

Directeur de Thèse,

Vous m'avez témoigné votre confiance en m'acceptant au sein de votre équipe de recherche et je vous en suis infiniment reconnaissant. J'y ai trouvé les meilleures conditions pour réaliser ma formation au sein d'une équipe compétente, dynamique et chaleureuse. Je vous remercie de m'avoir permis de bénéficier de votre savoir, de votre imagination et de votre expérience. Je m'attacherai désormais à en faire bon usage...

Monsieur le Professeur Raphaël ROUSSEAU,

Professeur des Universités d'Oncologie Pédiatrique,

Faculté de Médecine de Lyon

Praticien Hospitalier, service d'Oncologie Pédiatrique, Centre Régional de Lutte contre le Cancer Léon Bérard,

Vous me faites l'honneur de juger ce travail et je vous en remercie. Sachez que je suis extrêmement sensible à votre participation à l'estimation de ce projet scientifique et que je suis honoré vous ayez accepté de l'enrichir de votre savoir et de votre expérience.

Monsieur le Professeur Thomas BACHELOT,

Professeur des Universités d'Oncologie,

Faculté de Médecine de Lyon,

Praticien Hospitalier, service d'Oncologie, Centre Régional de Lutte contre le Cancer Léon Bérard,

Je vous suis très reconnaissant d'avoir accepté de me faire l'honneur d'être rapporteur et juge de ce premier travail scientifique. Sachez mon profond respect et ma sensibilité à votre disponibilité et vos conseils.

Monsieur le Professeur Jean-Louis CHARISSOUX,

Professeur des Universités de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique,

Faculté de Médecine de Limoges,

Chirurgien des Hôpitaux,

Je vous remercie d'avoir accepté de consacrer du temps à la lecture de mon manuscrit. La valeur de votre jugement est considérable à nos yeux. Je tiens par ailleurs à vous remercier de m'avoir fait bénéficier personnellement de vos connaissances et de m'avoir enseigné les techniques chirurgicales dont l'usage m'était indispensable durant ma thèse.

Monsieur le Docteur Jacques MONTEIL,

Praticien Hospitalier, Service de Médecine Nucléaire,

Ta participation à mon jury de thèse est un véritable plaisir au même titre que les moments durant lesquels nous avons travaillé ensemble. Ton efficacité et tes compétences m'ont permis de progresser dans un contexte amical et chaleureux. Je t'exprime mes plus sincères remerciements pour ta disponibilité sans limite et ta profonde gentillesse.

Mademoiselle le Docteur Aurélie DUTOUR,

Center for Cell and Gene Therapy Baylor College of Medicine, Houston,

Je suis ravi de ta présence à cette place. Ta trajectoire est exemplaire et je suis fier d'avoir pu travailler à tes côtés pendant quelques unes de ces dernières années. J'y ai appris l'efficacité, la rigueur et la générosité. Je te remercie d'avoir pris une part très active à ma formation, de m'avoir toujours aidé, encouragé et conseillé. Ta maturité est éloquente et les bénéfices de ton enthousiasme sont prodigieux. Je reste infiniment sensible à ta remarquable disponibilité et je ne peux oublier ni la qualité de tes conseils, ni la pertinence de tes pensées, ni l'ardeur de ta bienveillance.

Monsieur le Professeur Franck STURTZ,

Professeur des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de Limoges,

Praticien Hospitalier, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimie des Explorations Fonctionnelles, C.H.R.U. de Limoges,

Je vous dois une reconnaissance particulière pour la générosité que vous m'avez témoigné et l'intérêt constant que vous avez porté à mon travail. Vos recommandations et vos conseils ont été significatifs et votre aide incontestable.

Monsieur le Professeur Pierre DESCHAUX,

Professeur des Universités d'Immunologie,

Faculté des Sciences de Limoges,

Je vous remercie d'avoir toujours été disponible aux moments les plus importants. Je garde le souvenir de la confiance que vous m'avez accordée il y a quelques années et du soutien indéfectible dont j'ai pu bénéficier à vos cotés. Je n'oublie rien de votre implication personnelle, de vos conseils et de vos recommandations au moment déterminant de mon passage au sein de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé de Lyon. Sachez que je suis infiniment sensible à l'engagement que vous avez alors témoigné à mon égard, ainsi qu'à la sympathie et à la disponibilité dont vous avez toujours fait preuve. Soyez assuré de ma très grande reconnaissance.

Monsieur le Docteur Paul SLAOUTI,

Président du Comité de la Creuse,

Ligue Nationale contre le Cancer,

Votre confiance a incontestablement été l'un des éléments les plus déterminants de mon doctorat. Vous m'avez offert de travailler dans des conditions optimales, et jamais votre soutien ne m'a fait défaut. Je vous ai souvent dit ma reconnaissance et je continuerai à faire en sorte de vous témoigner ma gratitude en me rendant disponible de quelque manière que ce soit au sein du Comité de la Ligue contre le Cancer que vous présidez.

Monsieur le Professeur Jean-Christian BRETON,

Professeur Honoraire des Universités de Biochimie et Biologie Moléculaire,

Faculté de Médecine de Limoges,

Biologiste des Hôpitaux,

Je tiens à vous témoigner mon profond respect et ma sympathie. Votre attachement à perpétuer l'enrichissement des jeunes esprits et votre intérêt constant sont la marque de votre générosité et de votre bienveillance.

Madame le Docteur Hélène CHABLE-RABINOVITCH,

Maître de Conférence des Universités de Biochimie,

Faculté de Médecine de Limoges,

Praticien Hospitalier, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, Chimie des Explorations Fonctionnelles, C.H.R.U. de Limoges,

Je vous remercie de votre accueil au laboratoire, de votre gentillesse et de votre disponibilité. Les années passées sous votre responsabilité ont été placées sous le double sceau de la bonne entente et de l'enrichissement personnel. Je vous remercie de m'avoir inculqué (du moins tenté) votre inégalable sens de l'ordre, de l'organisation et de la rigueur scientifique. Recevez l'expression de ma sympathie et de mon respect.

Madame le Docteur Jeanne COOK-MOREAU,

Maître de Conférence des Universités d'Immunologie,
Faculté de Pharmacie de Limoges,

Reçois le témoignage de mes meilleures considérations. Tes compétences et ton dévouement sont servis par une gentillesse à toute épreuve. J'ai apprécié à leur juste valeur toutes tes qualités pendant ces quelques années passées ensemble.

Madame le Docteur Karine DURAND,

Laboratoire de Biochimie Médicale,
Faculté de Médecine,

Ta participation à mon travail est inestimable. Tes qualités sont exemplaires. Elles s'étendent de ta capacité à aider en toutes circonstances, à résoudre les difficultés les plus tenaces, à distribuer autour de toi les bénéfices de ta pertinence, en passant par ta générosité au travail, ta patience, ton honnêteté et évidemment, ta gentillesse et ta joie de vivre. Je t'exprime mon immense reconnaissance pour la somme prodigieuse de tout ce que tu as fait pour moi, mais surtout je t'exprime mon admiration face à la multitude de tes capacités, l'étendue de tes compétences et la maturité de ton expérience. La véritable modestie existe bien. Travailler à tes côtés fut autant un enrichissement qu'un plaisir de chaque instant.

Mademoiselle le Docteur Guislaine BARRIERE,

Laboratoire de Biochimie Médicale,
Faculté de Médecine,

Ta gentillesse m'a accompagné en toutes circonstances pendant ces quelques années, et je t'exprime ma reconnaissance pour ton aide précieuse et ta disponibilité. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté durant mon doctorat, pour ton écoute et tes conseils. Tes compétences scientifiques et ta rigueur m'ont été d'un profit inestimable. Sois assurée de mes meilleurs sentiments.

Mademoiselle le Docteur Barbara AKLA,

Je n'oublie pas les moments que nous avons passés ensemble, ni les heures que tu as réservées à m'enseigner ce que tu savais déjà. Ton parcours et ta réussite m'ont toujours laissé admiratif et ont motivé mon travail. Tout n'est que mérite. J'espère profondément que ta réussite soit prospère. Mais qui en douterait un instant...

Monsieur Yoanne MOUSSEAU,

Je te souhaite la réussite que tu mérites. Tes qualités ne laissent pas la place au doute. Je te dois une reconnaissance particulière pour les mises au point que tu as fait pour moi, pour l'aide précieuse et les avis que tu m'as apportés aux moments importants.

Monsieur le Docteur Yasser BAAJ,

Je suis convaincu que tes efforts de réussite seront récompensés comme il se doit. Je respecte ton courage autant que j'apprécie ta gentillesse et ta bonne humeur. Ta sympathique compagnie depuis ton arrivée au laboratoire fut un réel plaisir. Je n'oublie pas ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin.

Mademoiselle Barbara BESSETTE,

Tu n'as jamais hésité une seconde à m'apporter ton aide. Elle fut précieuse à bien des égards et tu sais à quel je te suis reconnaissant d'avoir pris le temps de soulager mon inimitié pour les toutes petites bêtes...

Monsieur le Professeur François PARAF,

Professeur des Universités, Faculté de Médecine de Limoges, Praticien Hospitalier d'Anatomie Pathologie, C.H.R.U. de Limoges,

Je te remercie de ta participation à ce travail et de ta promptitude à apporter ton soutien et ton aide. Reçois ici le témoignage de mes meilleures considérations.

Madame Hélène DZUGAN,

Reçois le témoignage de ma grande considération et de mon affection. Ta participation à toutes les activités du laboratoire a toujours été synonyme d'enthousiasme et de bonne humeur. Ta patience et ta gentillesse sont inaltérables. Te côtoyer fut un plaisir.

Madame Annette LABROUSSE,

Je vous remercie d'avoir toujours été disponible lorsque j'en avais besoin. Recevez l'expression de mon respect et de ma sympathie.

Madame Marie-Hélène PRADEAU,

Ta présence au laboratoire a toujours été un plaisir. Tu participes grandement à ce qui rend notre « petite famille » tellement enthousiaste et agréable. Je garderai ton souvenir associé aux meilleurs moments que j'ai passés au laboratoire.

A l'ensemble des personnes qui m'ont aidé et soutenu, particulièrement **Marie-Juliette DOUSSAUD-LESAGE, Sandra JUGE, Hao QIU, Mathieu LAURICHESSE, Muriel « Désirée » URBE, Murielle GREGOIRE, Stéphane CHARRET, Marie-Claude GUINIER, Agnès SPARZA, Thierry GOUGAM, Marie-Claire BACLET,**

Je vous témoigne ma sympathie et vous fais part de ma satisfaction et de mon plaisir à vous avoir rencontré au laboratoire. Vos qualités respectives ont agrémenté davantage encore une atmosphère conviviale et dynamique. Tous mes vœux vous accompagnent.

Résumé

La lymphangiogenèse correspond au processus physiologique qui aboutit à la formation de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir du réseau vasculaire initial. Son implication est particulièrement décisive au moment du développement tumoral, en participant notamment à la potentialisation de la dissémination dans l'organisme des cellules métastatiques. Les nouvelles stratégies thérapeutiques destinées à limiter la dissémination des métastases, point critique de l'évolution tumorale, désignent de plus en plus fréquemment les vaisseaux lymphatiques comme des cibles d'intérêt. Au cours de nos travaux, nous avons réalisé des récepteurs circulants dans le but d'inhiber la lymphangiogenèse tumorale. Ces molécules ont été conçues à partir du gène humain du récepteur VEGFR-3, seul inducteur connu à ce jour de la lymphangiogenèse tumorale, en réponse aux facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D. Nos résultats indiquent que les récepteurs circulants inhibent la croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques d'origine humaine, réduisent leur capacité de migration en réponse aux facteurs de croissance tumoraux et empêchent l'organisation de structures vasculaires lymphatiques en formation.

Mots-clé : cancer, lymphangiogenèse, VEGFR-3, VEGF-C, VEGF-D, récepteur circulant.

Abstract

Lymphangiogenesis corresponds to the neo-formation of lymphatic vessels. Tumor development is associated with an increase in the vascular networks near the tumor. The production of growth factors stimulating the neo-formation of lymphatic vessels by cancer cells constitutes one of the adaptations responsible for metastatic propagation. VEGF-C and VEGF-D are released by tumor cells and bind to a unique receptor expressed on lymphatic endothelial cells : VEGFR-3. It has been established that VEGFR-3 mediated activation of endothelial cells is crucial for tumor cell spread via lymphatic vessels. For this reason, inhibiting VEGF-C and VEGF-D interaction with VEGFR-3 appears to be a promising strategy to prevent tumor spread to lymphatic nodes. Here we report the design of chimeric soluble VEGFR-3 aimed at trapping VEGF-C and VEGF-D and their capacity to inhibit *in vitro* endothelial lymphatic cell migration and formation of microtubules. We demonstrated that gene transfer of VEGFR-3 coding plasmid to CHO cells is efficient, that the protein produced can be secreted and is active. Secreted VEGFR-3 was able to inhibit proliferation and migration of VEGF-C/-D stimulated endothelial lymphatic cells in a collagen-matrix assay. We also showed that the chimeric VEGFR-3 receptors prevented lymphatic cells from forming microtubules.

Title : Anti-lymphangiogenesis circulating receptors : cloning of the coding sequence of the human VEGFR-3 gene and applications in cancerology.

Keywords : cancer, lymphangiogenesis, VEGFR-3, VEGF-C, VEGF-D, circulating receptor.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADP : adénosine diphosphate

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARNt : Acide ribonucléique de transfert

ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

ATP : adénosine triphosphate

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Albumine sérique bovine

CD : Cluster of Differentiation

Cdk : Cyclin dependent kinases

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPB : CREP binding protein

DEPC : Diethyl pirocarbonate

DMEM : milieu minimum essentiel Dulbecco's modification de Eagle

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DNase : désoxyribonucléase

dNTP : Dinucléotides triphosphate

DO : Densité optique

ECL : « Enhancer chemiluminescence » : amplificateur de chimioluminescence

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ERK : extracellular signal regulated kinase

FTN : facteur de transcription nucléaire

GDP : Guanosine 5'-DiPhosphate

GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2

GTP : Guanosine 5'-TriPhosphate

HEPES : acide N-[2-hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2-éthanesulfonide]

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HRE : Hypoxia Response Element

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

kb : Kilo bases

kDa : Kilo daltons

LB : Luria broth

LYVE-1 : lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1

MEC : matrice extracellulaire

MEK : MAP/ERK kinase

MMP : Matrix metalloproteinase

NK : Naturel Killer

NLS : Signal de Localisation Nucléaire

NO : Monoxyde d'azote

Nrp : Neuropiline

pb : Paire de base

PBS : Phosphate buffer saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PECAM : Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule

PDGF : Platelet-derived growth factor

PM : Poids Moléculaire

Prox 1 : Prospero-related homeobox 1

RNase : Ribonucléase

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

RPA : Reparation Protein A

RPM : Rotations par minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RT : reverse transcription

SDS : Sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE : Electrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS

SOS : son of sevenless

SVF : Sérum de veau foetal

TAE : Tris-EDTA-acide acétique

Tc : technétium

TILs : Lymphocytes T infiltrants les tumeurs

TK : thymidine kinase

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

UV : ultraviolet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Table des matières

I - Etude bibliographique.....	26
I- 1 - Croissance et développement tumoral.....	26
I- 1 - 1 - Mécanisme et caractéristiques générales de la tumorigenèse	26
I- 1 - 1 - 1 - Initiation du processus tumoral.....	26
I- 1 - 1 - 1 - 1 - Activation des proto-oncogènes	26
I- 1 - 1 - 1 - 2 - Rôle des anti-oncogènes.....	29
I- 1 - 1 - 1 - 3 - La réparation des dommages de l'ADN	36
I- 1 - 1 - 1 - 3 - Résistance à l'apoptose	41
I- 1 - 1 - 1 - 4 - Les télomérases	43
I- 1 - 1 - 2 - Caractéristiques des cellules cancéreuses.....	45
I- 1 - 1 - 2 - 1 - Morphologie	45
I- 1 - 1 - 2 - 2 - Métabolisme	46
I- 1 - 2 - Les voies du développement tumoral	48
I- 1 - 2 - 1 - L'angiogenèse.....	48
I- 1 - 2 - 1 - 1 - Définition et caractéristiques générales.....	48
I- 1 - 2 - 1 - 2 - Angiogenèse et progression tumorale	48
I- 1 - 2 - 1 - 3 - Chronologie de l'angiogenèse tumorale.....	50
I- 1 - 2 - 1 - 4 - Initiation du processus angiogénique	52
I- 1 - 2 - 1 - 5 - Rôle des intégrines	54
I- 1 - 2 - 1 - 6 - Les marqueurs de l'angiogenèse	56
I- 1 - 2 - 2 - La lymphangiogenèse	57
I- 1 - 2 - 2 - 1 - Définition et caractéristiques générales.....	57
I- 1 - 2 - 2 - 2 - Lymphangiogenèse et progression tumorale.....	58
I- 1 - 2 - 2 - 3 - Caractère lymphophile des cancers	60
I- 1 - 2 - 2 - 4 - Cas particulier des lymphomes	61
I- 1 - 2 - 2 - 4 - 1 - Maladie de Hodgkin.....	61
I- 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - Lymphomes malins non hodgkiniens	62
I- 1 - 2 - 2 - 5 - Mécanisme moléculaire de la lymphangiogenèse.....	63
I- 1 - 2 - 2 - 6 - Les marqueurs de la lymphangiogenèse.....	65
I- 1 - 3 - La dissémination métastatique	66

I - 1 - 3 - 1 - Les étapes du processus métastatique.....	66
I - 1 - 3 - 2 - Les voies de dissémination métastatique.....	68
I - 1 - 3 - 2 - 1 - L'extension lymphatique.....	68
I - 1 - 3 - 2 - 2 - L'extension hématogène	69
I - 1 - 3 - 2 - 3 - La dissémination directe par cavité naturelle.....	70
I - 1 - 3 - 3 - Différences entre les types tumoraux	71
I - 2 - Les nouvelles thérapies anti-cancéreuses.....	79
I - 2 - 1 - La thérapie génique.....	79
I - 2 - 1 - 1 - Thérapie génique <i>ex vivo</i>	79
I - 2 - 1 - 2 - Thérapie génique <i>in vivo</i>	79
I - 2 - 1 - 3 - 1 - La thérapie génique par gène suicide	80
II - Partie expérimentale.....	95
II - 1 - Matériels et méthodes	95
II - 1 - 1 - Culture cellulaire	95
II - 1 - 1 - 1 - Cellules CHO	95
II - 1 - 1 - 2 - Cellules hTERT-HDLEC	96
II - 1 - 1 - 3 - Coculture verticale des cellules CHO et hTERT-HDLEC.....	96
II - 1 - 1 - 4 - Courbes de croissance	99
II - 1 - 1 - 5 - Test d'inhibition de la chimiotaxie.....	100
II - 1 - 1 - 6 - Test d'inhibition de la formation des tubules lymphatiques	102
I - 1 - 2 - Clonage de la séquence d'intérêt	102
II - 1 - 2 - 1 - Extraction des ARN totaux	102
II - 1 - 2 - 2 - Transcription inverse (RT).....	103
II - 1 - 2 - 3 - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	105
II - 1 - 2 - 4 - Construction du vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO [®] TA/hVEGFR-3	107
II - 1 - 3 - Amplification du vecteur recombinant.....	109
II - 1 - 3 - 1 - Transformation bactérienne.....	109
II - 1 - 3 - 2 - Amplification et extraction du vecteur recombinant.....	110
II - 1 - 3 - 2 - 1 - Minipréparations	110
II - 1 - 3 - 2 - 2 - Maxipréparations	111

II - 1 - 4 - Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie.....	112
II - 1 - 5 - Electrophorèse en gel d'agarose	113
II - 1 - 6 - Transfection des cellules	113
II - 1 - 6 - 1 - Technique de transfection par la lipofectamine	113
II - 1 - 6 - 2 - Préparation des cellules CHO	114
II - 1 - 6 - 3 - Cytotoxicité de la zéocine sur les cellules CHO	116
II - 1 - 6 - 4 - Co-transfection avec le plasmide pOG44.....	117
II - 1 - 6 - 5 - Sélection des clones cellulaires	119
II - 1 - 7 - Analyse de l'expression des récepteurs circulants hVEGFR-3	119
II - 1 - 7 - 1 - Extraction des protéines	119
II - 1 - 7 - 2 - Western blot	120
II - 1 - 7 - 2 - 1 - Migration des protéines : électrophorèse sur gel SDS-PAGE	120
II - 1 - 7 - 2 - 2 - Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	120
II - 1 - 7 - 2 - 3 - Incubation avec les anticorps	121
II - 1 - 8 - RT-PCR quantitative	122
II - 1 - 8 - 1 - Lignées cellulaires.....	122
II - 1 - 8 - 2 - Transcription inverse.....	122
II - 1 - 8 - 3 - PCR quantitative en temps réel de VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 et G6PDH.....	123
II - 1 - 9 - Imagerie médicale.....	126
II - 1 - 9 - 1 - Principe de la lymphoscintigraphie au technétium radioactif	126
II - 1 - 9 - 2 - Visualisation du ganglion sentinelle	127
II - 2 - Résultats.....	128
II - 2 - 1 - Elaboration de la séquence d'intérêt hVEGFR-3	128
II - 2 - 1 - 1 - Détermination de la séquence codante d'intérêt	128
II - 2 - 1 - 2 - Synthèse par réaction RT-PCR	131
II - 2 - 2 - Clonage.....	133
II - 2 - 2 - 1 - Introduction de la séquence hVEGFR-3 d'intérêt dans le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO®TA.....	133
II - 2 - 2 - 2 - Vérification par digestions enzymatiques	134
II - 2 - 2 - 3 - Vérification par séquençage	137

II - 2 - 3 - Transfections	140
II - 2 - 3 - 1 - Transfection des cellules CHO par le vecteur pFRT.....	140
II - 2 - 3 - 2 - Isolement des clones CHO/pFRT.....	140
II - 2 - 3 - 3 - Co-transfection des cellules CHO/pFRT par pOG44 et pSecTag/FRT/V5-His TOPO [®] TA/hVEGFR-3	141
II - 2 - 3 - 4 - Isolement des clones CHO-RC	141
II - 2 - 4 - Mise en évidence de la production des récepteurs circulants.....	142
II - 2 - 4 - 1 - Vérification de l'intégration des plasmides recombinants	142
II - 2 - 4 - 2 - Western Blot.....	144
II - 2 - 5 - Evaluation de l'efficacité des récepteurs circulants	146
II - 2 - 5 - 1 - Coculture des cellules hTERT-HDLEC et CHO-RC.....	151
II - 2 - 5 - 2 - Inhibition de la migration cellulaire	154
II - 2 - 5 - 3 - Inhibition de la formation des tubules lymphatiques	162
II - 2 - 5 - Etude de l'expression de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 dans différentes lignées tumorales.....	171
II - 2 - 6 - Détection du ganglion sentinelle	179
III - Discussion et perspectives	182
III - 1 - Les récepteurs circulants inhibent la croissance et le développement des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques humains <i>in vitro</i>	184
III - 1 - 1 - Inhibition de la croissance cellulaire.....	184
III - 1 - 2 - Inhibition de la migration cellulaire	185
III - 1 - 3 - Inhibition de la formation des tubules.....	187
III - 2 - L'environnement physiologique peut-il s'opposer à l'efficacité des récepteurs circulants <i>in vivo</i> ?.....	188
III - 2 - 1 - Efficacité des récepteurs circulants et interactions pharmacologiques	189
III - 2 - 2 - Récepteurs circulants et réponse immunitaire.....	190
III - 3 - Quelle est la meilleure voie d'administration des récepteurs circulants pour une indication anti-tumorale ?.....	191
III - 5 - L'imagerie médicale peut-elle constituer un outil efficace d'évaluation d'un traitement anti-lymphangiogénique ?.....	197

III - 4 - La lymphangiogenèse tumorale est-elle susceptible de contourner une stratégie anti-VEGFR-3 ?	199
III - 6 - L'angiogenèse tumorale peut-elle est stimulée en cas d'inhibition de la lymphangiogenèse ?	200
III - 7 - Perspectives : couplage des stratégies anti-lymphangiogenique et anti-angiogénique	202
IV - Conclusion	204
ANNEXES	235
Publications	236

Introduction

La lymphangiogenèse est un processus physiologique indispensable au fonctionnement normal de l'organisme. Elle correspond à la néo-formation et au renouvellement du réseau des vaisseaux lymphatiques, dont les implications concernent l'hydratation tissulaire, le maintien de l'homéostasie, la détoxification du milieu interstitiel et la réponse immunitaire.

Au moment du développement tumoral, la plupart de ces fonctions bénéficient aux tumeurs dont la progression requière la mise en place d'une vascularisation appropriée, susceptible de répondre aux exigences d'une évolution proliférative. L'enrichissement de la vascularisation lymphatique péri-tumorale est alors accentué par la production et la libération de facteurs de croissance par les cellules cancéreuses elles-mêmes, ce qui favorise l'évolution tumorale et potentialise la dissémination métastatique.

Ces facteurs de croissance, essentiellement le VEGF-C et le VEGF-D, interagissent avec un récepteur situé sur les cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, nommé VEGFR-3, en entraînant une cascade de signalisation à l'origine de la formation de néo-vaisseaux lymphatiques dans le stroma péri-tumoral.

Le réseau vasculaire lymphatique est par conséquent considéré dans de nombreux cas de cancers comme la voie primaire de dissémination des métastases. Une stratégie thérapeutique consistant à limiter au maximum la néovascularisation lymphatique péri-tumorale pourrait constituer un élément substantiel pour limiter la progression et la dissémination tumorale dans certains types de cancers comme les cancers du sein, de la sphère ORL, du testicule, du poumon, de la peau, de la thyroïde ou encore du côlon.

L'objectif de notre travail a consisté à concevoir des récepteurs VEGFR-3 circulants destinés à neutraliser les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D avant leur fixation sur les récepteurs VEGFR-3 membranaires, afin d'exercer une inhibition compétitive de la voie de transduction du signal lymphangiogénique, dans les conditions de la pathologie tumorale.

Une étude préalable à l'élaboration de cette stratégie est présentée dans la partie bibliographique. Elle regroupe la plupart des informations relatives à la compréhension des mécanismes de l'induction tumorale, des implications de l'angiogenèse et de la

lymphangiogenèse dans la biologie des tumeurs solides, et décrit la dissémination métastatique comme le point critique majeur de la progression tumorale. Une synthèse de quelques nouvelles orientations thérapeutiques introduit la description du détail de nos travaux basés sur l'utilisation des techniques récentes de la biologie moléculaire pour finaliser la conception des récepteurs circulants anti-lymphangiogéniques dont l'efficacité et plausibilité seront finalement débattus.

I - Etude bibliographique

I - 1 - Croissance et développement tumoral

I - 1 - 1 - Mécanisme et caractéristiques générales de la tumorigenèse

I - 1 - 1 - 1 - Initiation du processus tumoral

La survenue et la progression d'une tumeur maligne sont le résultat d'une accumulation d'évènements génétiques complexes altérant le fonctionnement normal d'un certain nombre de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la division cellulaire. Les gènes considérés comme ayant une implication significative dans la mise en place du processus tumoral sont les oncogènes, les anti-oncogènes et les gènes de réparation de l'ADN. Toutefois, tout gène qui, quel que soit son niveau d'action, dans toutes les cellules ou seulement dans des types cellulaires de différenciation donnée, intervient dans le contrôle de la division cellulaire peut, si son fonctionnement ou sa structure est modifié, être à l'origine d'une croissance cellulaire anormale et par conséquent d'une transformation cancéreuse.

I - 1 - 1 - 1 - 1 - Activation des proto-oncogènes

Les oncogènes sont des gènes susceptibles de conférer le phénotype tumoral à une cellule eucaryote normale. Ils sont dérivés de gènes cellulaires appelés proto-oncogènes ayant subi une ou plusieurs modifications qualitatives ou quantitatives.

Il est commun de considérer six classes d'oncogènes selon le type de protéine qu'ils codent :

- Les facteurs de croissance : le gène c-SIS code la chaîne B du facteur de croissance dérivé des plaquettes ou PDGF ; les gènes v-int 1 et v-int 2 commandent la synthèse d'un facteur de croissance des fibroblastes.

- Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance : c-FMS code le récepteur membranaire à activité tyrosine kinase du facteur de croissance des macrophages ou CSF-1 ; le proto-oncogène erb B code le récepteur au facteur de croissance de l'épiderme ou EGF.

- Les protéines G : Ras code une protéine du même nom qui tient un rôle essentiel dans la transduction des signaux mitogéniques. Le gène Ras est muté dans 25% de tous les cancers (Shirasawa *et al.*, 1993).

- Les tyrosines protéines-kinases membranaires.

- Les protéines-kinases cytosoliques. Par exemple, l'oncogène c-SRC qui code une tyrosine kinase de la membrane cytoplasmique interne.

- Les facteurs de transcription nucléaire.

Les mécanismes à l'origine de l'activation des proto-oncogènes sont nombreux :

Elle peut résulter de l'insertion d'un ADN viral au niveau d'un gène régulateur. L'intégration de la séquence virale se fait de manière aléatoire et aboutit à la formation d'un gène chimère à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride anormale (HBV, HPV, HTLV I, HTLV II). Par exemple, le virus de l'hépatite B (HBV) tient un rôle important dans l'apparition des cancers du foie. Deux cas d'activation d'un gène cellulaire par insertion de ce virus ont été décrits dans des carcinomes hépatiques. Dans le premier cas, le gène modifié est celui du récepteur β à l'acide rétinoïque qui est apparenté au proto-oncogène c-ERB A. Dans le second cas, l'incorporation du génome viral se produit dans un intron du gène d'une cycline A participant au contrôle de la division cellulaire (Di Bisceglie, 1989 ; Dejean *et al.*, 1990 ; Wang *et al.*, 1990).

Cette activation peut également se produire à la suite de l'apparition d'une ou plusieurs mutations ponctuelles dans la séquence codant un proto-oncogène et aboutissant à une modification fonctionnelle de la protéine. Les mutations faux-sens, qui entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre, sont susceptibles d'activer des proto-oncogènes en oncogènes, en affectant par exemple un site catalytique de la protéine ou en provoquant une

activation substitutive de la protéine. C'est le cas de la protéine Ras, qui après mutation du proto-oncogène est bloquée en conformation active.

L'activation des oncogènes peut être consécutive à une ou plusieurs délétions aboutissant soit à la perte de la fonctionnalité de la protéine, soit à une activation anormale de celle-ci. C'est le cas de l'activation du proto-oncogène *erb B* codant le récepteur à l'EGF.

L'amplification génique peut également être initiatrice de l'activation oncogénique. Elle correspond à une augmentation anormale du nombre de copies d'un gène ou d'un segment chromosomique. Les copies surnuméraires se trouvent alors soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de minichromosomes surnuméraires. L'amplification génique provoque généralement une augmentation du niveau d'expression du gène. Les gènes N-MYC et L-MYC ont été isolés du fait de leur forte amplification, respectivement dans des neuroblastomes et des cancers du poumon à petites cellules. Dans ces deux cas, le niveau d'amplification semble être en corrélation avec la rapidité d'évolution de la tumeur (Slavc *et al.*, 1990 ; Rygaard *et al.*, 1993).

Les translocations chromosomiques sont le résultat d'un échange de matériel génétique entre deux chromosomes. Ces modifications provoquent des juxtapositions et des fusions aberrantes de gènes. Elles sont responsables de la formation de gènes hybrides résultant parfois de la fusion de régions codantes, entraînant la synthèse de protéines chimériques non fonctionnelles. Les cassures à l'origine des translocations chromosomiques sont généralement attribuées au hasard et la probabilité d'apparition est théoriquement la même dans tous les points du génome. Des variations peuvent être générées par la structure chromatinienne (despiralisation, ADN-Z), par des sites spécifiques de coupure des ADN topoisomérases II, par des sites hypersensibles à la DNase I ou par des séquences Alu répétées (Strissel *et al.*, 1998). Ces ruptures sont associées à deux processus distincts : un processus de dérégulation de l'expression des gènes qui aboutit à la production d'une protéine normale en excès, et un processus de sélection qui génère des protéines de fusion anormales et qui ne favorise que les produits de fusion conférant un avantage prolifératif.

I - 1 - 1 - 1 - 2 - Rôle des anti-oncogènes

Dans le déterminisme complexe des cancers, la simple activation oncogénique ne permet pas d'expliquer certaines prédispositions héréditaires aux tumeurs, certaines anomalies caryotypiques dans les cellules néoplasiques et surtout les données expérimentales obtenues sur les hybrides somatiques. En effet, dès 1969, Harris démontrait la possibilité, à partir de la fusion de cellules malignes avec des cellules normales, d'obtenir une lignée de cellules hybrides non tumorigène. Ce phénomène de « suppression tumorale » évoquait dès lors l'existence d'un ou plusieurs gènes provenant de la cellule normale et susceptible de corriger une fonction déficiente dans les cellules malignes (Harris *et al.*, 1969).

I - 1 - 1 - 1 - 2 - 1 - Anti-oncogènes et régulation du cycle cellulaire

En 1971, Knudson envisageait que la transmission dominante autosomique de certaines formes de cancers héréditaires puisse faire intervenir des mutations récessives « perte de fonction » au niveau cellulaire. Cette hypothèse a servi de base au travail d'identification des anti-oncogènes encore appelés gènes suppresseurs de tumeurs. Ces gènes sont capables de réguler négativement le cycle cellulaire et d'induire la mort cellulaire programmée. Ils agissent principalement au moment de la transition des phases G1 et S du cycle cellulaire. Cette transition est sous la dépendance des facteurs de transcription de la famille E2F qui contrôlent l'expression de gènes indispensables à la phase S de synthèse de l'ADN (Figure B1).

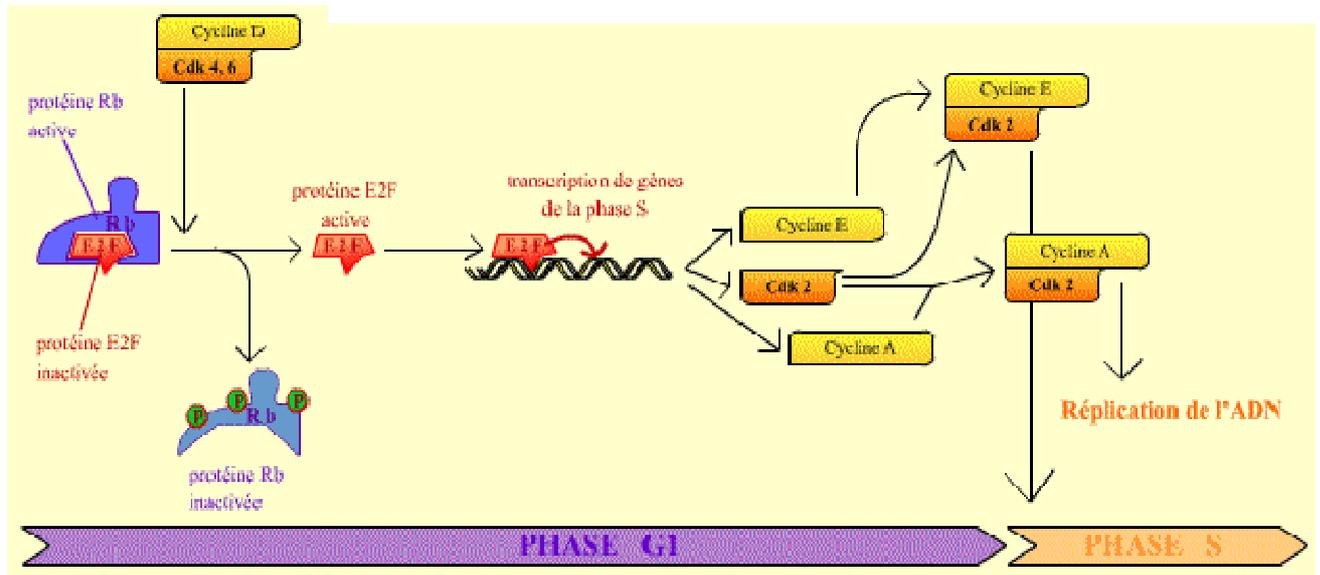


Figure B1 : La transition G1/S du cycle cellulaire.

Les protéines de la famille E2F existent soit sous forme libre, soit sous forme inactive complexée à la protéine RB. L'aptitude de la protéine RB à fixer les facteurs de transcription E2F dépend de son état de phosphorylation. En effet, lorsque la protéine RB est non phosphorylée, elle est active et peut fixer les facteurs E2F, ayant pour conséquence un blocage de la transition G1/S. Lorsque la protéine RB est phosphorylée, elle devient inactive et incapable de fixer la protéine E2F qui, libérée, permet la transition G1/S. La phosphorylation de RB est elle-même sous la dépendance de complexes protéiques jouant un rôle de verrou moléculaire au niveau de la transition entre les différentes phases du cycle cellulaire. Ces complexes sont composés d'unités régulatrices, les cyclines, et d'unités catalytiques, les kinases dépendantes de cyclines ou CDK (Cyclin Dependant Kinase) (Figure B2). L'association de ces deux sous-unités constitue le complexe actif.

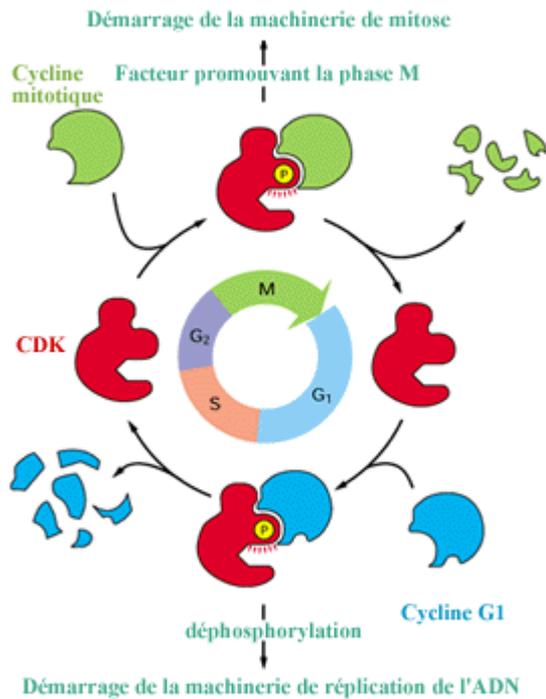


Figure B2 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/cdk.

Les complexes cyclines/CDK sont eux-mêmes régulés par des protéines inhibitrices (p15, p16, p18, p19, p21, p27 et p57) qui agissent en se fixant sur les CDK, empêchant ainsi la constitution du complexe actif. Le gène p21, inhibiteur de CDK, est régulé par la protéine p53 au niveau transcriptionnel. La protéine p53 régule la transcription de nombreux gènes dont certains contrôlent l'apoptose.

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeur sont multiples. Elles ont pour conséquence une activation du processus tumoral. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions ou encore d'anomalies de la méthylation des promoteurs inhibant la transcription de ces gènes. La voie biologique contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition entre les phases G1 et S et passant par les anti-oncogènes p53, p16 et RB est la voie la plus fréquemment altérée dans de nombreux cas de cancers. Par exemple, l'inactivation constitutionnelle de l'anti-oncogène RB est à

l'origine des formes héréditaires de rétinoblastomes et représente également un risque génétique pour le développement d'ostéosarcomes (Issing *et al.*, 1993 ; Iida *et al.*, 2003). Le mélanome malin familial peut résulter de mutations de p16 ou de CDK (Kannan *et al.*, 2003) et les mutations somatiques de p16 sont généralement retrouvées dans tous les cas de tumeurs solides (Milde-Langosch *et al.*, 1998 ; Geisler *et al.*, 2002). Les mutations somatiques de p53 représentent l'altération moléculaire la plus fréquemment observée dans les tumeurs solides et les mutations constitutionnelles de ce gène représentent la base moléculaire du syndrome de Li-Fraumeni, syndrome prédisposant à un très large spectre de tumeurs incluant en particulier des sarcomes des tissus mous, des ostéosarcomes, des tumeurs du système nerveux central, des cancers du sein et des corticosurrénales (Khayat *et al.*, 2004 ; Lang *et al.*, 2004).

I - 1 - 1 - 1 - 2 - 2 Cas particulier de p53

Le gène p53 est un anti-oncogène dont l'importance en cancérologie est immense. De nombreux cas de pathologies cancéreuses sont directement corrélés avec des délétions ou des mutations dans ce gène. On considère aujourd'hui que dans 60 % des cancers environ, une ou plusieurs anomalies sont retrouvées dans l'anti-oncogène p53 (Andreassen *et al.*, 1993 ; Levine *et al.*, 1994). Ces mutations sont généralement des inversions faux-sens ou des homozygoties avec perte de l'allèle sauvage. C'est le cas notamment dans les cancers du colon, de la vessie, de l'œsophage, de l'estomac, du foie, du sein, du poumon (Hollstein *et al.*, 1991). Les sites de localisation de ces mutations sont spécifiques du type tumoral.

Dans les conditions normales, la protéine p53 est vouée à entraîner la cellule vers un processus apoptotique ou un arrêt du cycle cellulaire en cas d'anomalie détectée sur la matrice génomique avant la réplication de la molécule d'ADN incorrecte. Cette disposition biologique est destinée à permettre à la machinerie de correction d'épreuve de rectifier l'erreur et ainsi éviter sa propagation.

Le mécanisme par lequel p53 permet cette interruption est désormais connu. La protéine est en fait un facteur de transcription qui se fixe sur la molécule d'ADN au niveau d'une séquence particulière. Il en résulte une intervention de cette molécule dans le déterminisme et le déroulement du cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un gène nommé WAF1 / Cip1 (Wild Type p53-activated fragment / cdk2 inhibiting protein). L'expression du

gène WAF1 / Cip1 grâce à la protéine p53 permet la production d'une autre protéine, p21, qui se lie au couple cycline E / cdk4 ou cycline E / cdk2 pour inhiber leur complexation et leur activité (Figure B3). Cette cascade provoque l'inhibition de la phosphorylation de la protéine Rb et par suite, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Latham *et al.*, 1996 ; Chen *et al.*, 2003).

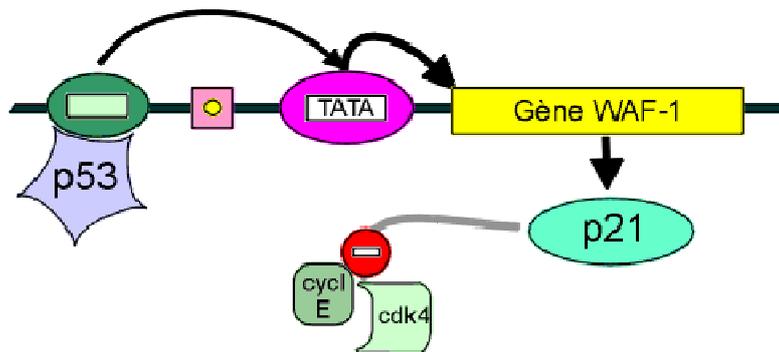


Figure B3 : Intervention de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.

Lorsque le cycle cellulaire est bloqué, la protéine p53 est capable de stimuler la transcription de gènes dirigeant la synthèse de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. C'est le cas notamment de la protéine GADD45. Celle-ci est susceptible de localiser des altérations chromatiniennes, de stimuler la réparation de l'ADN par un mécanisme d'excision ou encore d'inhiber l'entrée en phase S du cycle cellulaire en cas de dommage irréversible. La protéine p53 possède par ailleurs la faculté de recruter directement les facteurs XPC et TFIIH qui interviennent dans l'excision des nucléotides de la molécule d'ADN endommagée.

Le gène p53 est localisé sur le chromosome 17, en position 17p13.1. Il code une phosphoprotéine de 53 kDa composée de 393 acides aminés. Dans les cellules normales, la protéine p53 est exprimée faiblement, mais son expression devient considérable dans la grande majorité des cellules tumorales (Caruso *et al.*, 1999 ; Dong *et al.*, 2005). Il a été constaté que cette caractéristique était en réalité la conséquence d'une diminution de la dégradation physiologique de la protéine associée à une augmentation de sa demi-vie.

Une augmentation du taux de p53 a pu être obtenue expérimentalement en générant des lésions dans la double hélice de la molécule d'ADN, ou même sur un seul des brins. Ces anomalies dans la structure du gène sont suffisantes pour provoquer la surexpression de la protéine et finalement l'arrêt du cycle cellulaire (Giarnieri *et al.*, 2000 ; Bali *et al.*, 2004 ; Burke *et al.*, 2005) (Figure B4).

Un des mécanismes de destruction des cellules tumorales par radiothérapie ou par chimiothérapie fait intervenir p53. Ces protocoles induisent des modifications dans les structures géniques. Les cellules non cancéreuses, qui possèdent la version normale de p53, répondent à son mécanisme de blocage du cycle cellulaire pour permettre la réparation des anomalies génétiques. Les cellules tumorales, en revanche, qui ne possèdent que le gène p53 muté, poursuivent les synthèses et les réplifications du matériel génétique, les accumulent jusqu'à ce que l'anormalité cellulaire se traduise par une létalité (Lowe *et al.*, 1994).

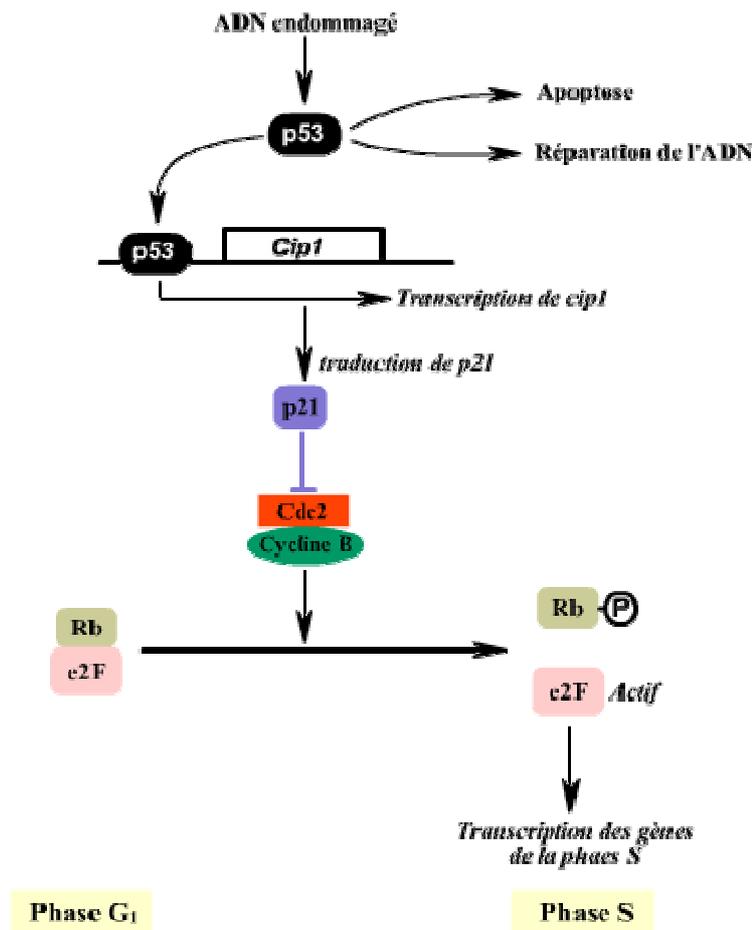


Figure B4 : Régulation du cycle cellulaire et dommages de l'ADN.

L'endommagement de la molécule d'ADN s'accompagne d'une augmentation de l'expression de p53. Il en résulte une évolution de la cellule soit vers l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN, soit vers l'apoptose. Dans le premier cas, p53 induit alors l'activation de la transcription du gène Cip1 codant la protéine p21, qui inhibe les complexes cdk/cyclines.

I - 1 - 1 - 1 - 3 - La réparation des dommages de l'ADN

De la même manière que pour le cas des gènes suppresseurs de tumeurs, l'altération des gènes de réparation de l'ADN peut être un facteur déclenchant de la cancérogenèse.

La correction des anomalies génétiques introduites dans les séquences d'ADN par des agents mutagènes, qu'ils soient endogènes ou exogènes, ou l'incorporation de nucléotides erronés au moment de la réplication est réalisée grâce à plusieurs types de mécanismes : les recombinaisons, le mécanisme d'excision des bases, qui inclue un couplage avec la machinerie transcriptionnelle, et la réparation des mésappariements. Dans le cas particulier de la réparation des mésappariements, la correction requiert l'intervention de deux complexes hétérodimériques, nommés respectivement hMutS alpha et hMutS beta. Chacun des hétérodimères comporte une sous-unité du gène HMSH2 et une sous-unité hMSH6/GTBP ou hMSH3. hMutS alpha corrige préférentiellement les erreurs d'appariement de huit bases ainsi que la plupart des délétions-insertions d'un nucléotide. Le complexe hétérodimérique hMutS beta, quant à lui, s'associe fréquemment avec les mésappariements de deux à cinq nucléotides pour les rectifier. Chaque hétérodimère hMutS alpha et hMutS beta voit son activité associée à celle de l'hétérodimère hMutL alpha, structure formée de deux protéines nommées hMLH1 et hPMS2. La fonctionnalité de ce système complexe permet dans un premier temps la reconnaissance du brin incorrect et réalise alors l'excision de la séquence encadrant la structure erronée. La séquence éliminée par ce processus d'exclusion peut dans certains cas compter jusqu'à un millier de nucléotides. La dernière étape de réparation opérée par ce système se ponctue par la synthèse d'un brin ne comportant aucune erreur, reconstitué à partir de la matrice complémentaire de l'ADN endommagé.

Il est désormais acquis que les fonctions de réparation des mésappariements sont altérées dans les tumeurs qui présentent une instabilité des microsatellites. Cependant, étant donné que les séquences microsatellites sont généralement localisées dans des régions non codantes des gènes, peu de ces altérations se matérialisent par l'expression d'une quelconque anomalie. Cependant, certaines mutations provoquent effectivement l'inactivation du gène concerné, et peuvent être impliquées dans l'initiation d'un processus oncogénique : c'est le cas du gène hMSH6, du gène du récepteur II au TGF- β ou encore du gène bax. De plus, on accorde aujourd'hui l'hypothèse selon laquelle il existerait deux formes d'instabilité

génétique : l'instabilité des microsatellites et l'instabilité chromosomique (Lengauer *et al.*, 1997, Oda *et al.*, 2005).

Un certain nombre de tumeurs héréditaires, comme le syndrome de Muir-Torre ou celui de Turcot révèlent la présence de mutations au niveau des gènes de réparation des mésappariements dans les cellules germinales. C'est également le cas dans certaines tumeurs colorectales de type héréditaire non polyposiques. Il est retrouvé systématiquement chez les individus qui développent ces pathologies une hétérozygotie pour un gène de réparation des mésappariements alors que l'allèle normal est inactivé par mutation ponctuelle, délétion ou méthylation, à un stade précoce du processus dysplasique (Kolodner *et al.*, 1994 ; Hamilton *et al.*, 1995 ; Han *et al.*, 1995).

En outre, dans 15 à 25 % des cancers de l'estomac, de l'endomètre et du colon, on retrouve une instabilité des microsatellites, ce qui permet de suspecter une mutation dans un gène de réparation des mésappariements. Il s'agit alors principalement de mutations dans les gènes hMSH2 et hMLH1. Dans le cas des cancers de l'endomètre, on retrouve plus fréquemment des anomalies dans les gènes hMSH6/GTBP et MSH3 (Gurin *et al.*, 1999 ; Kuismanen *et al.*, 2002).

Sur le plan clinique, il a été démontré que les patients ayant développé une tumeur colorectale dans laquelle un gène de réparation des mésappariements est activé, présentent une espérance de vie significativement plus importante que les patients chez lesquels aucun gène de réparation des mésappariements n'est actif.

I - 1 - 1 - 1 - 3 - 1 - Origine des altérations et modifications engendrées

Les molécules d'ADN peuvent être endommagées au niveau des bases puriques ou des bases pyrimidiques. Des modifications dans la conformation des bases sont susceptibles de se produire spontanément. Cependant, les nucléotides peuvent également être substitués au moment de la réplication de l'ADN par des composés analogues, comme la 5-bromo-uracile ou encore la 2-aminopurine. Les bases peuvent par ailleurs subir des réactions d'éthylation ou de méthylation provoquées par des agents alkylants (Kaina *et al.*, 1998). Ces nucléotides sont également susceptibles d'être perdus, avec apparition de sites abasiques. Ils peuvent également être substitués par d'autres nucléotides (Leonard *et al.*, 1988 ; Hartwig *et al.*, 1996).

La structure en double hélice de la molécule d'ADN peut être perturbée par la formation de ponts entre deux bases sur le même brin (pontages intrabrin) ou entre deux bases sur les brins complémentaires (pontages interbrin). Les rayonnements ultraviolets génèrent la formation de ponts entre des pyrimidines (Griffiths *et al.*, 1998; Muller *et al.*, 1998). Les agents antitumoraux bifonctionnels tels que le cisplatine forment des ponts entre purines adjacentes. D'une manière comparable, à la suite de leur intercalation entre les plateaux de bases au sein de la double hélice d'ADN, certaines molécules forment des liaisons covalentes très stables entre deux purines ou entre deux pyrimidines portées par les brins opposés. D'autres substances, comme le formaldéhyde, entraînent la formation de ponts entre l'ADN et les protéines qui entrent dans la constitution des chromosomes (Ma *et al.*, 1988).

Les ruptures de type simple et double brin de la molécule d'ADN peuvent être la conséquence directe des rayonnements ionisants ou être provoquées indirectement par les radicaux libres produits par des substances radioactives ou résultant du métabolisme oxydatif (Esterbauer, 1993). La destruction d'un désoxyribose, sous l'effet des rayonnements ionisants par exemple, peut également provoquer la rupture de liaisons phosphodiester. De nombreuses molécules génotoxiques sont susceptibles de se fixer sur l'ADN de manière covalente et entraîner la formation d'adduits au niveau de l'ADN (Fessard *et al.*, 1996 ; Tannenbaum, 1997). Les adduits correspondent à l'association entre l'élément cancérigène et le désoxyribonucléotide sur lequel il s'est fixé. Il a été démontré que les hydrocarbures polycycliques aromatiques contenus dans la fumée de cigarette ou encore les produits de combustion peuvent induire sur les nucléotides de l'ADN des produits d'addition très variés. (Lewtas *et al.*, 1992). De nombreuses perturbations cellulaires ont été recensées comme pouvant être à l'origine de lésions sur la molécule d'ADN (Tableau B1).

Stress cellulaire	Lésion occasionnée sur l'ADN
<i>Origine endogène</i>	
Variations du pH	Dépurination, dépyrimidation
Métabolisme oxydatif	Dommages de bases, cassures de brins, adduits sur les bases
Erreurs dans la fidélité de la réplication	Substitution des bases, érosion des télomères, correction des mésappariements
Méthyltransférase	Méthylation aberrante dans CpG
Topo-isomérase	Rupture des brins
<i>Origine exogène</i>	
<i>Physique</i>	
Radiations ionisantes UV (A, B, C) Infrarouges	Rupture des brins, dommages de bases Dimères de pyrimidine, dommages de bases Désamination des protéines nucléaires, dépurination
<i>Chimique</i>	
Composés naturels ou synthétiques, Produits de combustion Médicaments Métaux et minéraux	Adduits sur les bases Ruptures de brins, pontages, dommages de bases et adduits, intercalation Substitution ou dommages de bases, ruptures de brins

Tableau B1 : Types de dommages de l'ADN suivant le stress cellulaire (Thomas, 1998).

I - 1 - 1 - 1 - 3 - 2 - Les mécanismes de réparation

La stabilité du patrimoine génétique d'un individu est assurée d'une part par la fidélité de la réplication des molécules d'ADN et d'autre part par la précision de la ségrégation des chromosomes au moment des divisions cellulaires mitotiques et de la différenciation méiotique. Les systèmes destinés à réparer les lésions de l'ADN participent de la même manière au maintien de l'intégrité du génome. Ces mécanismes de réparation de l'ADN fonctionnent en corrélation avec certains systèmes de contrôle du cycle cellulaire (Hartwell, 1992). Lorsque l'ADN subit des mutations ou des dégradations, la réponse cellulaire se caractérise soit par une activation de la machinerie de réparation de l'ADN, soit, lorsque les dommages sont trop importants, par le déclenchement du mécanisme apoptotique.

Les dégradations ou modifications subies par l'ADN doivent être corrigées avant le début du processus de réplication de l'ADN, de telle sorte d'éviter la propagation de ces erreurs. De cette nécessité est apparue la mise en place d'un système complexe de contrôle de l'état de l'ADN s'opérant avant la transition G1/S qui constitue l'une des étapes critiques du cycle cellulaire, puisqu'il correspond au moment de la réplication de l'ADN (Kastan *et al.*, 1991). Une autre vérification de l'état de l'ADN se fait avant le moment de la mitose, c'est-à-dire avant l'étape de ségrégation des chromosomes. Chacun des systèmes de réparation de l'ADN dispense une action ciblée à un type de dommage. De plus, il est désormais connu que plusieurs mécanismes interagissent entre eux de manière à améliorer la réparation de certaines lésions (Sugawara *et al.*, 1997).

Le système de recombinaison homologue est un mécanisme cellulaire de réparation de l'ADN extrêmement efficace qui consiste à substituer la séquence altérée par une séquence similaire intacte. Il s'agit en l'occurrence d'un système de réparation des cassures doubles chaînes de l'ADN. Ces ruptures sont souvent la conséquence des radiations ionisantes, mais il arrive parfois qu'elles soient induites de manière endogène au cours de la vie cellulaire. La recombinaison homologue est reconnue comme ayant une action non négligeable dans la prévention anti-tumorale. Dans ce processus, un complexe, nommé RAD51, agit en corrélation avec les protéines onco-suppressives p53, mais également BRCA1 et BRCA2

(Buchhop *et al.*, 1997 ; Marmorstein *et al.*, 1998). La perte d'hétérozygotie de la protéine RAD54, un cofacteur de RAD51, a été décrite dans certains types tumoraux.

Le complexe RPA (Reparation Protein A) est un ensemble multifonctionnel qui se fixe sur les molécules d'ADN monocaténares afin de faciliter le déroulement de l'ADN, le stabiliser, et potentialiser ainsi les étapes d'initiation d'une part et d'élongation d'autre part au moment de la réplication. Cependant, RPA est également un élément important dans le mécanisme d'excision de nucléotides lors de la réparation des lésions induites à l'ADN par les rayonnements ultra-violet. Le complexe interagit *in vivo* avec la molécule p53 par l'intermédiaire d'une séquence de 20 acides aminés localisés immédiatement en aval des 73 acides aminés de la fraction transactivatrice de la protéine situés dans la partie N-terminale de p53. Il a été démontré que cette liaison de fixation entre p53 et le complexe RPA est abrogée par les rayonnements ultra-violet et pourrait constituer la première étape de l'activation du point de contrôle de p53 (Abramova *et al.*, 1997).

I - 1 - 1 - 1 - 3 - Résistance à l'apoptose

On distingue deux modalités selon lesquelles les cellules peuvent mourir : la mort par nécrose, accidentelle et provoquée par un facteur physique (brûlure, compression...) ou chimique toxique ou encore par l'absence de matières nutritives, et la mort dite programmée des cellules autrement appelée apoptose qui tient un rôle régulateur du système d'équilibre et de renouvellement tissulaire. L'apoptose, contrairement à la nécrose, ne provoque pas de réaction inflammatoire.

La mort cellulaire est programmée dans deux situations : soit au terme de la durée de vie assignée à un type cellulaire particulier, par exemple quatre mois en moyenne pour les globules rouges alors qu'elle n'est que de quelques heures seulement pour les polynucléaires sanguins, soit pour éliminer des cellules anormales, dysfonctionnelles, ou devenues inutiles au terme de processus physiologiques tels que certaines étapes embryogéniques.

Lorsque des lésions irréparables de l'ADN, l'activation de proto-oncogènes, ou encore l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs induit le déclenchement de l'apoptose, il en résulte une élimination d'un risque potentiel pour l'organisme de propager ces anomalies par le biais des divisions cellulaires. L'apparition de cellules cancéreuses au sein d'un tissu, puis leur multiplication jusqu'à l'organisation d'un tissu tumoral, impliquent un échappement de ces cellules pourtant génétiquement anormales par rapport au processus apoptotique. L'inactivation de la protéine p53, facteur important du déclenchement de l'apoptose, de même que la production excessive de la protéine Bcl-2, facteur inhibiteur du processus apoptotique, peuvent conférer aux cellules cancéreuses une forme de résistance à l'apoptose potentialisant l'initiation du processus oncologique.

Il a été mis en évidence que le gène bcl-2 est activé dans certains lymphomes (Tsujiimoto *et al.*, 1987 ; Monni *et al.*, 1997), alors que le gène bax, dont l'action est activatrice de la mort cellulaire programmée, est muté dans de nombreuses tumeurs solides (Yagi *et al.*, 1998 ; Knudson *et al.*, 2001). De plus, certaines voies de signalisation aboutissent à l'interruption du contrôle négatif qui consiste à réguler parallèlement la prolifération et l'apoptose cellulaire. L'oncogène bcl2 code une protéine de 26 kDa, localisée le plus souvent dans la membrane externe des mitochondries, dans le réticulum endoplasmique lisse et au niveau des membranes nucléaires. Son action anti-oxydante est considérée comme la principale cause responsable du blocage du processus apoptotique.

Dans le cas des cancers de la prostate hormono-indépendants, il a été mis en évidence que l'expression de bcl-2 est constatée chez 65% des patients (MacDonnell *et al.*, 1997). Par ailleurs, il est désormais connu que l'action anti-apoptotique de l'oncogène bcl-2 est particulièrement impliquée dans les mécanismes de survie qui déclenchent la croissance androgéno-indépendante des cellules cancéreuses, et induit un phénomène de résistance à la chimiothérapie (Colombel *et al.*, 1993 ; Raffo *et al.*, 1995). Plus récemment, il a été démontré que l'obtention d'un clone cellulaire androgéno-indépendant issu de la lignée hormono-dépendante LNCaP était corrélée à une diminution de l'expression de la protéine p53 et à l'augmentation de l'expression de bcl-2 (Tso *et al.*, 2000). L'activation de l'oncogène bcl-2 inhibe l'apoptose induite par p53 et prolonge la survie cellulaire sans affecter la prolifération (Chiou *et al.*, 1994).

I- 1 - 1 - 1 - 4 - Les télomérase

La division *in vitro* des cellules embryonnaires humaines non pathologiques est limitée en moyenne à une cinquantaine de mitoses. Les cellules présentent alors des signes de sénescence puis meurent par apoptose. Dans une population cellulaire normale il existe en effet un « compteur de cycles » dénombrant les divisions cellulaires. Le principe du fonctionnement de ce système se situe au niveau des télomères des chromosomes. Ces structures se raccourcissent à chaque cycle cellulaire (Figure B5). Après un certain nombre de divisions, les télomères devenus trop courts sont responsables de l'induction d'un signal à l'origine de l'entrée des cellules en sénescence. Si les cellules n'entrent pas en sénescence, un dernier raccourcissement des télomères déclenche un chaos chromosomique (fusions, dislocations chromosomiques) fatal à toute cellule non pathologique (Hahn *et al.*, 2001 ; Gisselsson *et al.*, 2001).

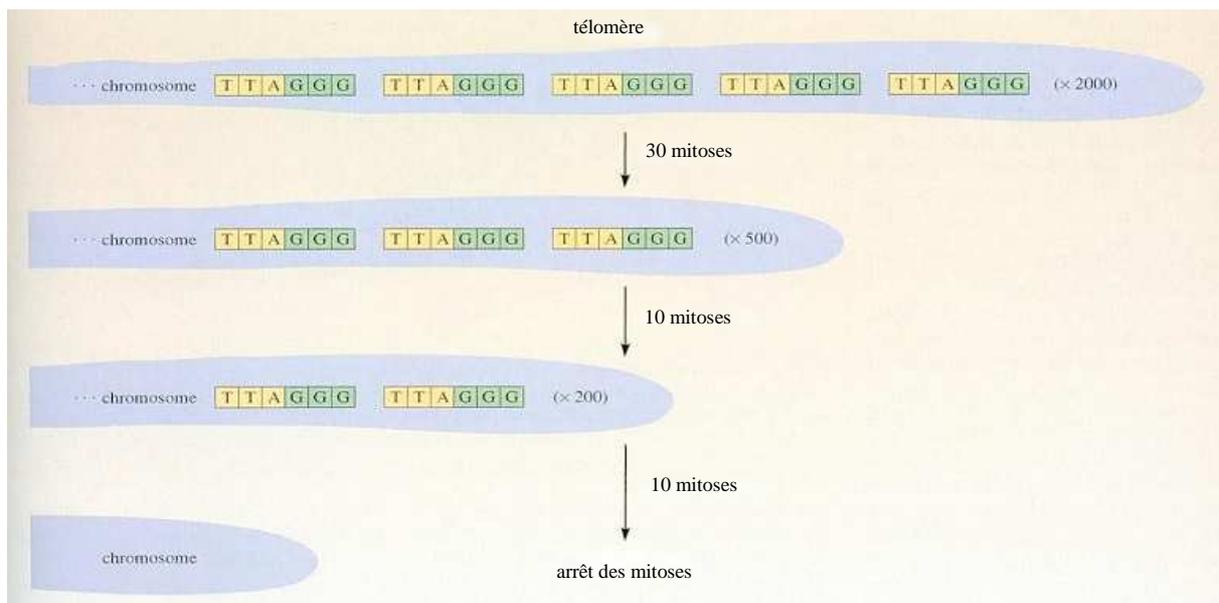


Figure B5 : Principe du raccourcissement des télomères.

Les télomères sont des complexes d'ADN et de protéines qui constituent l'extrémité des chromosomes et les protègent des dégradations et des fusions termino-terminales. Chez l'Homme, la partie nucléique a une taille comprise entre 5 et 15 kb et correspond à la répétition du fragment (TTAGGG)_n (Callen *et al.*, 2004). Ce sont des régulateurs du nombre de réplifications programmées pour une cellule.

Dans les cellules normales les télomères se raccourcissent progressivement, de division cellulaire en division cellulaire, à raison de 50 à 200 pb à chaque mitose. Cette disposition est associée au contrôle de la limitation du caractère prolifératif de ces cellules. Ce phénomène serait lié à l'incapacité des ADN polymérase à répliquer les extrémités ADN linéaires des chromosomes eucaryotes. Au contraire, les télomères des cellules cancéreuses gardent une longueur stable, ce qui implique le fait que ces cellules ont acquis la capacité de maintenir la stabilité des séquences télomériques du fait de l'activité des télomérases. Pour cela, les télomérases réparent systématiquement les télomères en ajoutant des séquences TTAGGG en 3' des télomères lésés (Counter *et al.*, 1992).

Les télomérases sont des enzymes dont l'activité est responsable du potentiel prolifératif indéfini des cellules tumorales. Une activité télomérase est constatée dans 85% à 90% des cancers humains. Chez l'Homme, l'activité télomérase n'existe pas dans les cellules différenciées. Elle n'est observée que dans les cellules germinales et les cellules souches intestinales, hématologiques et cutanées (Forsyth *et al.*, 2002). Les télomérases ont un rôle fondamental dans l'immortalisation des cellules. Ces enzymes sont constituées de deux sous-unités principales : une sous-unité hTR (human Template RNA) et une sous-unité hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase), ayant une homologie avec la transcriptase inverse du virus du SIDA. La sous-unité catalytique hTERT semble avoir un rôle prédominant. Cette protéine fait partie de la famille des transcriptases inverses. Elle est exclusivement exprimée dans les cellules présentant une activité télomérase. L'activation de hTERT correspond à une étape décisive de la progression tumorale et se trouve être substantiellement impliquée dans la transformation maligne des cellules humaines (Arai *et al.*, 2002 ; Moriarty *et al.*, 2002).

I- 1 - 1 - 2 - Caractéristiques des cellules cancéreuses

I- 1 - 1 - 2 - 1 - Morphologie

Bien qu'elles conservent souvent des caractéristiques biologiques résiduelles des cellules normales, les cellules tumorales acquièrent des propriétés nouvelles dues à la transformation maligne. En outre, la cellule tumorale est souvent plus grande que la cellule qui lui a donné naissance, jusqu'à devenir dans certains cas une cellule géante. L'augmentation de taille des cellules n'est pas uniforme au sein d'une même population. Ce phénomène est désigné par le terme d'anisocytose. Cette caractéristique n'est cependant pas spécifique aux lignées cancéreuses.

Il est généralement observé une augmentation du rapport nucléoplasmique du fait d'une augmentation globale du volume nucléaire. Les cellules néoplasiques présentent généralement un noyau d'aspect irrégulier et pouvant posséder plusieurs nucléoles. On constate également une augmentation de la baso-chromatine qui est irrégulièrement répartie. Le caryotype est anormal. Les chromosomes peuvent présenter des formes anormales, par exemple en X, en V ou en cercle.

Le cytoplasme présente généralement une basophilie accrue, par augmentation de la quantité d'ARNm. Il est peu abondant, souvent vacuolisé, avec un réseau de filaments d'actine désorganisé et une augmentation du nombre des ribosomes. Les filaments intermédiaires, quant à eux, ne sont pas modifiés. Le cytoplasme des cellules cancéreuses peut contenir des inclusions de kératine, de mélanine, de lipides, de glycogène.

Le plasmolemme est modifié, sa teneur en acides sialiques et en gangliosides est diminuée. La mobilité latérale de ces protéines intrinsèques est souvent augmentée. La quantité de fibronectines est généralement plus basse que dans les cellules normales.

Le nombre des mitochondries est réduit. Celles-ci sont parfois fragmentées et présentent un nombre de crêtes inférieur à celui des cellules non cancéreuses. Le génome mitochondrial peut se révéler anormal. Par exemple, dans le cas de certaines leucémies, la quantité d'ADN mitochondrial est amplifiée et le génome se présente sous la forme de chaînons d'ADN circulaire. De plus, les enzymes mitochondriales peuvent être altérées ou

quantitativement réduites. C'est notamment le cas de la F1-ATPase et de la glutamate déshydrogénase.

L'observation en microscopie électronique des membranes cellulaires indique un aspect irrégulier et une structure épaissie. On observe des microvillosités. Les desmosomes sont altérés, ce qui rend les cellules moins cohésives.

I - 1 - 1 - 2 - 2 - Métabolisme

Il est commun de mettre en avant un certain nombre de différences fondamentales permettant de distinguer le métabolisme de cellules saines de celui de cellules cancéreuses :

- La division des cellules cancéreuses, astreinte dans le cas de cellules normales à de nombreuses régulations, devient incontrôlée. Les cellules prolifèrent et leur multiplication anarchique est à l'origine de la génération de lignées dites « immortelles ». Ce processus tient un rôle essentiel dans la transformation maligne, car il permet l'accumulation d'un grand nombre d'anomalies dans le génome des cellules de la lignée. Des anomalies peuvent survenir au moment des mitoses, comme des dissymétries de répartition, une dispersion anarchique avec répartition chromosomique inégale. On constate également parfois des anomalies globales, comme l'absence de clivage des noyaux malgré la présence de fuseaux. Le nombre de chromosomes peut être modifié et l'on peut constater une polyploïdie (3N, 4N, 8N chromosomes) ou une haploïdie (N chromosomes) (Lengauer *et al.*, 1998 ; Ponder 2001). Cette instabilité génomique est un événement précoce qui tient un rôle fondamental dans la progression tumorale (Tlsty *et al.*, 1992).

- La seconde différence remarquable est l'autonomisation de la division cellulaire. Les cellules saines ne se divisent que lorsqu'elles en reçoivent l'information. De nombreuses molécules, inhibitrices ou stimulatrices, exercent par leur activité le contrôle de la division cellulaire. Cette information peut être transmise de cellule à cellule par l'intermédiaire d'un certain nombre de jonctions permettant la communication inter-cellulaire. Une cellule cancéreuse a perdu une partie de ces capacités de relation cellule-cellule et devient en quelque sorte autonome, moins assujettie aux régulations pouvant lui être transmises par les cellules à proximité.

- Une autre singularité des cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales réside en leur perte de l'inhibition de contact. Les cellules saines, lorsqu'elles se sont divisées jusqu'à arriver au contact les unes des autres subissent une pression de contact exercée sur leur cytosquelette. Cette contrainte physique est à l'origine de l'activation d'une voie de transduction du signal responsable de l'inhibition spécifique du processus de division cellulaire. Les cellules cancéreuses sont caractérisées par une perte de cette inhibition de contact. Leur nombre s'accroît régulièrement alors qu'il reste relativement constant dans les tissus sains. Ce phénomène est à l'origine du développement d'une hyperplasie, puis d'une tumeur.

- Une quatrième particularité de ces cellules est à retenir. Elle repose sur leur capacité de migration et d'infiltration des tissus voisins, à l'origine de leur envahissement. Certaines cellules, appelées cellules métastatiques, peuvent en effet se détacher du foyer tumoral d'origine et s'infiltrer au travers des structures tissulaires à proximité par l'intermédiaire de la sécrétion de protéases qui dissocient les tissus permettant à ces cellules de s'insinuer à travers les membranes tissulaires et éventuellement de rejoindre la circulation générale. Les cellules métastatiques sont ainsi véhiculées en de nombreux points de l'organisme et peuvent alors coloniser de nouveaux territoires, assurant par là-même la dissémination des cellules tumorales.

- De plus, on observe la plupart du temps dans le cas des cellules tumorales une perte de la nécessité d'ancrage, disposition qui confère en particulier aux cellules cancéreuses la capacité de se développer selon des conditions variables, et de poursuivre leur prolifération en milieu semi-fluide ou fluide, lors de la dissémination métastatique par exemple. Les cellules cancéreuses bénéficient par ailleurs d'une perte du point de restriction, ce qui leur permet, par opposition aux cellules normales, de poursuivre leur cycle cellulaire au delà de la phase G1 en cas de carence voire d'absence de certains facteurs de croissance.

I - 1 - 2 - Les voies du développement tumoral

I - 1 - 2 - 1 - L'angiogenèse

I - 1 - 2 - 1 - 1 - Définition et caractéristiques générales

L'angiogenèse est le processus physiologique par lequel se forment les nouveaux vaisseaux sanguins à partir du réseau vasculaire pré-existant. Elle est à distinguer de la vasculogenèse qui correspond à la constitution du réseau vasculaire initial au moment du développement embryonnaire (Risau, 1997). Dans les conditions physiologiques normales, l'angiogenèse tient un rôle important dans un certain nombre de processus biologiques tels que l'implantation du placenta, le renouvellement de l'endomètre, la formation du corpus luteum, la réparation tissulaire lors d'ischémies cardiaques et périphériques ou encore la cicatrisation.

Cependant, des anomalies dans la régulation normale du processus angiogénique peuvent être à l'origine d'un développement incontrôlé des nouveaux vaisseaux sanguins. La néovascularisation excessive peut alors participer à l'apparition ou à la progression de certaines pathologies comme les ulcères duodénaux, les arthrites rhumatoïdes, les rétinopathies diabétiques, les hémangiomes infantiles, l'athérosclérose, le psoriasis ou encore le développement tumoral. Les cellules de l'endothélium des vaisseaux comptent pourtant parmi les plus stables de l'organisme. En dehors du processus angiogénique, leur temps de renouvellement peut aller jusqu'à deux ou trois années, mais cette période est réduite à seulement cinq jours au moment de l'angiogenèse.

I - 1 - 2 - 1 - 2 - Angiogenèse et progression tumorale

Le développement tumoral nécessite la mise en place d'une vascularisation riche et adaptée aux spécificités métaboliques des cellules cancéreuses. En effet, afin d'assurer leur prolifération, les cellules tumorales ont besoin d'un apport en oxygène et en nutriments proportionnel à leur forte consommation énergétique. Par ailleurs, il leur est également indispensable de pouvoir éliminer les déchets provenant de leur métabolisme. Tant que l'épaisseur de la tumeur est inférieure à 1 ou 2 mm³, la simple diffusion à travers la paroi des vaisseaux à proximité suffit généralement à permettre ces échanges (Folkman, 1990). La

distance maximale entre le foyer tumoral et un vaisseau excède rarement 150 à 200 microns ; au-delà, la diffusion de l'oxygène n'est pas possible.

Par ailleurs, dans une tumeur, l'activité mitotique diminue considérablement en s'éloignant des vaisseaux. Pour poursuivre son développement prolifératif, la tumeur répond donc à cette nécessité vasculaire impérative en synthétisant puis en sécrétant des facteurs de croissance des vaisseaux destinés à stimuler l'angiogenèse à sa proximité immédiate (Figure B6).

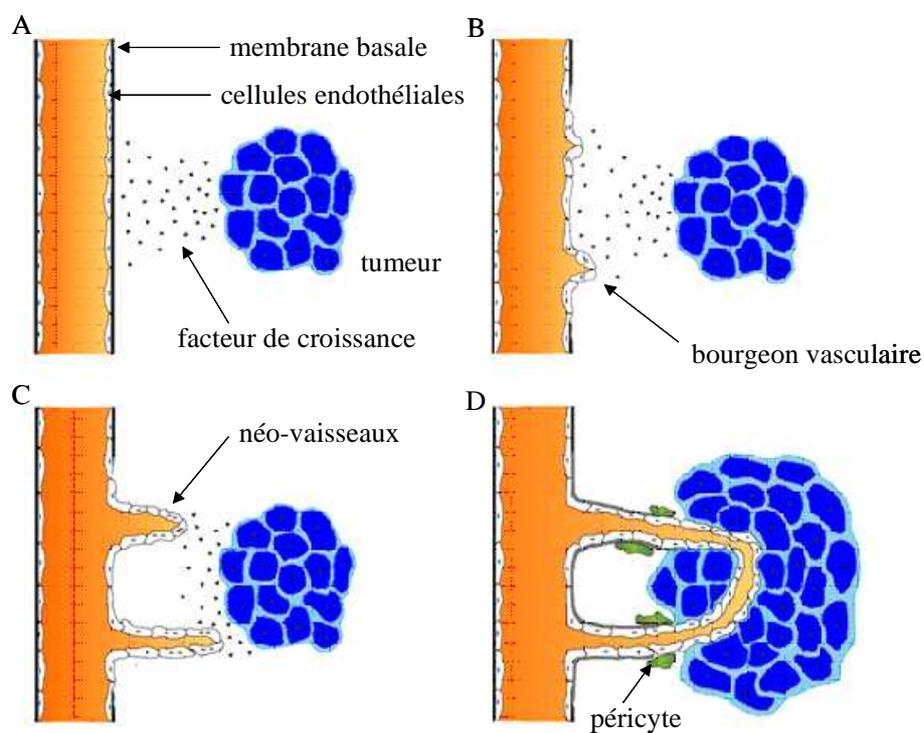


Figure B6 : Principe général de l'angiogenèse tumorale.

Il est désormais reconnu qu'il existe une corrélation entre le potentiel métastatique de nombreuses tumeurs et leur niveau de vascularisation. C'est le cas notamment de très nombreux carcinomes mais également de tumeurs des tissus mous, de tumeurs du système nerveux central et de myélomes (Weidner *et al.*, 1995). Par ailleurs, la densité de la vascularisation intratumorale est considérée comme un élément de pronostic fiable.

I - 1 - 2 - 1 - 3 - Chronologie de l'angiogenèse tumorale

Le déclenchement du processus angiogénique est la conséquence d'une situation hypoxique intratumorale. La prolifération anarchique et rapide du tissu tumoral en formation génère la formation de zones peu ou pas oxygénées au sein de la tumeur, ainsi que la compression des capillaires à proximité. L'activation de l'angiogenèse est alors réalisée par les cellules cancéreuses elles-mêmes, qui synthétisent et secrètent plusieurs types de molécules angiogéniques, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), dont les gènes sont régulés par un facteur sensible à l'hypoxie, nommé HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor1 α) (Fang *et al.*, 2001), ainsi que le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), qui diffusent jusqu'aux vaisseaux pré-existants (Skoldenberg *et al.*, 2001). Ces molécules stimulent la production de collagénase, d'héparinase, d'activateur du plasminogène (uPA), de métalloprotéinases de la matrice (MMP), telles que MMP-2 et MMP-9, par les cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins (Figure B7).

Ces enzymes sont à l'origine de la dégradation de la membrane basale qui entoure et soutient les vaisseaux. En effet, l'espace extracellulaire est composé d'un réseau complexe et dense que les cellules endothéliales doivent dégrader avant de pouvoir y migrer. La dégradation de la matrice extracellulaire a donc pour conséquence non seulement de libérer des facteurs de croissance qui, en l'absence de dégradation, resteraient séquestrés dans la matrice mais également de créer un espace libre pour les cellules endothéliales migrantes.

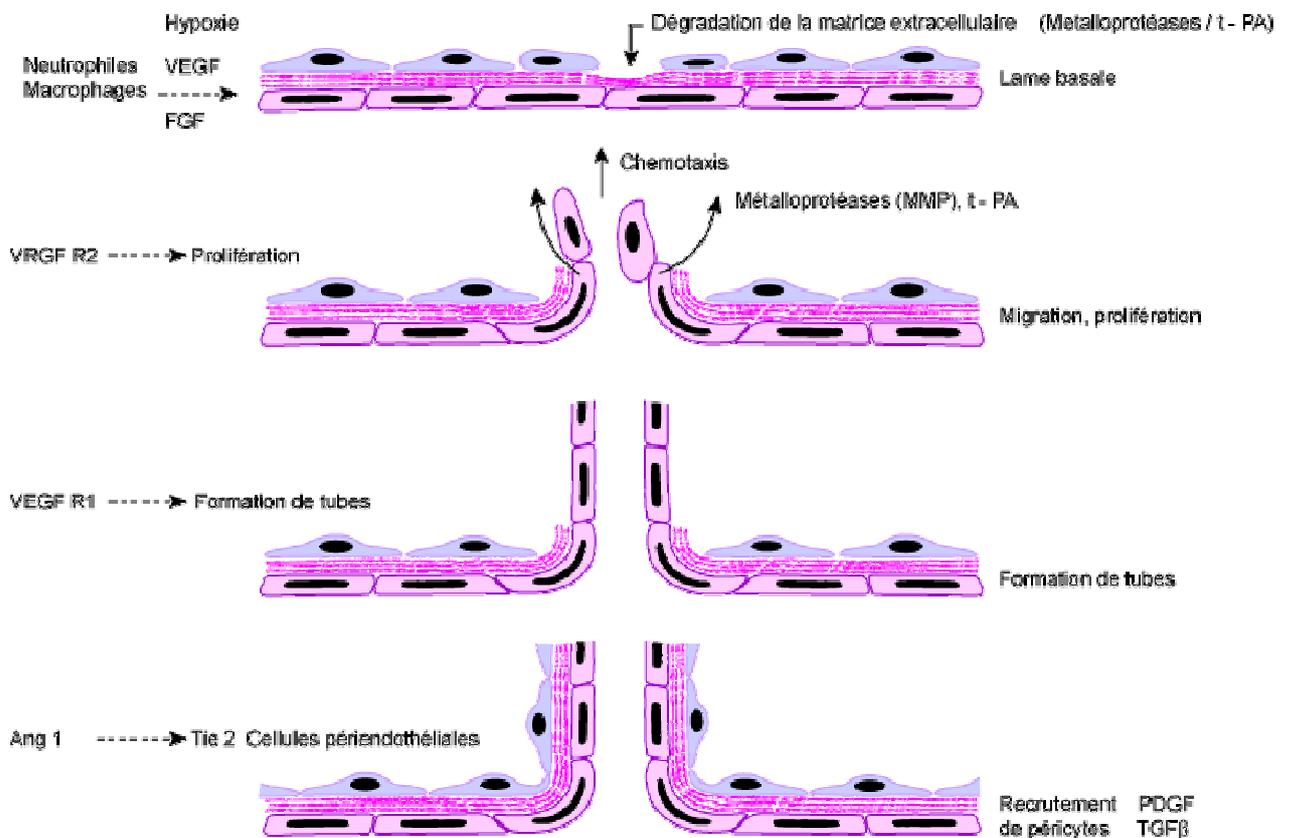


Figure B7 : Les étapes de l'angiogenèse tumorale.

Le premier obstacle que rencontre la cellule endothéliale est formé par la membrane basale. Elle est constituée de collagène de type IV, de laminine, de fibronectine et d'autres composants matriciels. La MMP-2, aussi appelée collagénase de type IV, participe à la dégradation de la membrane basale. Une fois cette barrière vasculaire franchie, les cellules endothéliales doivent progresser au travers des fibrilles de collagène, d'élastine, de protéines microfibrillaires et de protéoglycanes. La MMP-9, ou gélatinase B, lyse les fibres d'élastine et les noyaux protéiques des protéoglycanes (Iurlaro *et al.*, 1999 ; Edwards *et al.*, 2003).

Parallèlement, les cellules endothéliales activées par les facteurs de croissance acquièrent de nouvelles caractéristiques de prolifération et d'invasion tissulaire. Elles se détachent de la matrice extra-cellulaire et migrent en direction du stimulus angiogénique libéré par la tumeur, amorçant ainsi le bourgeonnement orienté du vaisseau parental.

I - 1 - 2 - 1 - 4 - Initiation du processus angiogénique

A ce jour, il est connu que l'activation moléculaire initiale de la formation des néo-vaisseaux sanguins se fait par l'intermédiaire d'une interaction entre le récepteur VEGFR-1 (Flt-1) ou le récepteur VEGFR-2 (Flk-1, KDR), localisés sur l'endothélium des vaisseaux sanguins, et de nombreux facteurs de croissance tels le VEGF (ou VEGF-A), le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E ou encore le PlGF (de Vries *et al.*, 1992 ; Brown *et al.*, 1993 ; Plate *et al.*, 1994 ; Viglietto *et al.*, 1995 ; Meyer *et al.*, 1999) (Figure B8).

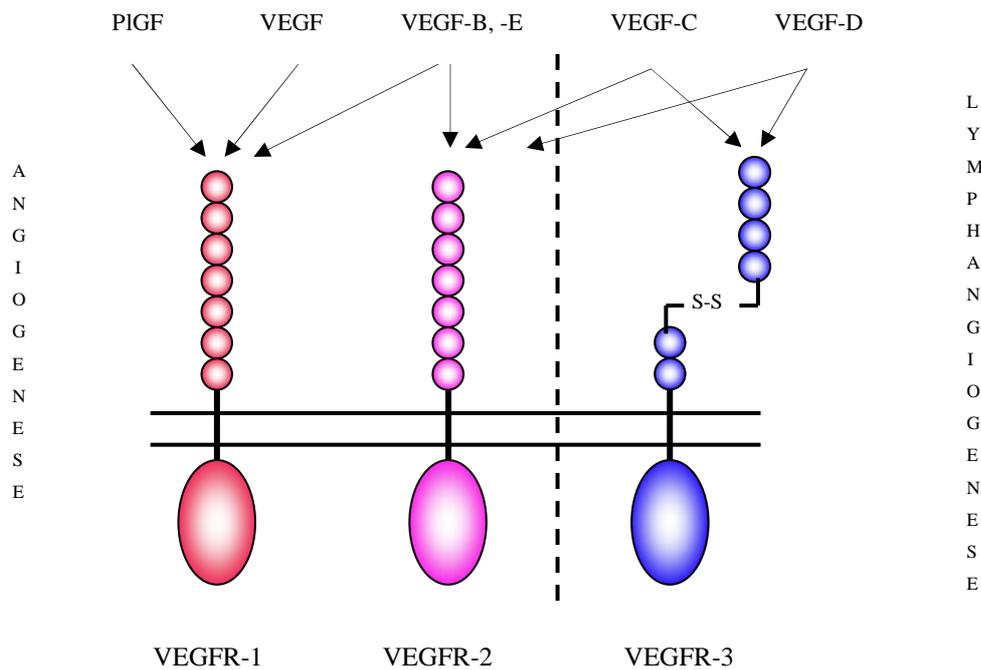


Figure B8 : Facteurs de croissance et récepteurs des synthèses vasculaires.

Il est actuellement décrit que VEGFR-1 est davantage impliqué dans la perméabilité cellulaire tandis que le récepteur VEGFR-2 est inducteur de l'effet mitogène et de la réponse proliférative des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Colavitti *et al.*, 2002). Par ailleurs, il est désormais connu que le récepteur VEGFR-1, qui peut être exprimé soit sous forme membranaire soit sous forme soluble, est plus spécifiquement activé par VEGF-A, VEGF-B et PlGF, alors que le récepteur VEGFR-2 semble davantage sous la dépendance des facteurs VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E (Cross *et al.*, 2003).

Les facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux sanguins sont des molécules fondamentales dans la biologie tissulaire normale et pathologique, dont la concentration doit être strictement contrôlée. Ainsi, l'inactivation d'un seul allèle du gène VEGF suffit à induire une létalité embryonnaire précoce. Ces facteurs angiogéniques qui commandent indirectement la formation des néo-vaisseaux sont synthétisés par les cellules cancéreuses lorsque certaines conditions limites sont atteintes. Ce sont ces conditions particulières, notamment hypoxiques, qui engendrent la surexpression des gènes des facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux sanguins.

La voie de signalisation en réponse aux conditions hypoxiques, principal facteur limitant le développement tumoral initial, débute par l'activation du facteur HIF-1 α . Celle-ci est induite par la molécule d'hème, les espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont produites par les mitochondries en cas de carence oxygénique, ainsi que par des cascades de phosphorylation cytoplasmiques. Les espèces réactives de l'oxygène ont en particulier une fonction de stabilisation du complexe HIF-1 α en réponse aux variations des potentiels d'oxydo-réduction (Chandel *et al.*, 1998).

Le complexe HIF-1 est constitué par deux sous-unités protéiques : HIF-1 β /ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), qui est continuellement exprimée, et HIF-1 α , qui n'est présente qu'au moment de la survenue de conditions hypoxiques. En fait, la sous-unité alpha est également synthétisée continuellement mais elle est systématiquement dégradée dans les conditions normoxiques, alors qu'elle s'accumule très rapidement dès l'apparition d'une carence en oxygène (Salceda *et al.*, 1997). Il devient alors possible à HIF-1 α , en démasquant son signal de localisation nucléaire (NLS), d'être internalisée et transloquée au travers de la membrane nucléaire. Un facteur nucléaire ARNT est alors recruté par HIF-1 α et

l'hétérodimère formé reconnaît la structure génique de l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE). L'activation finale des promoteurs des gènes des facteurs de croissance est réalisée lorsque les coactivateurs transcriptionnels, CPB (CREP binding protein) et p300 terminent la complexation avec HIF-1 α -ARNT et HRE. (Kallio *et al.*, 1998).

I- 1 - 2 - 1 - 5 - Rôle des intégrines

Ce sont des protéines insérées dans la membrane plasmique. Certaines sont impliquées dans le remodelage vasculaire au cours de l'angiogenèse. Elles sont formées par deux domaines, l'un intracellulaire court et l'autre, extracellulaire beaucoup plus volumineux. Le domaine extracellulaire interagit avec des protéines de la matrice extracellulaire alors que le domaine intracellulaire interagit avec certaines protéines du cytosquelette. Les intégrines ont, en particulier, une implication dans la communication cellulaire. Elles permettent d'assurer la transduction des signaux cellulaires entrant ou sortant. Elles sont formées par deux sous-unités α et β constituant un hétérodimère (Figure B9). Il existe 18 types de sous-unités α et 8 types de sous-unités β dont les assemblages peuvent être à l'origine d'une vingtaine d'intégrines différentes (Sanchez-Madrid *et al.*, 1983 ; Longhurst *et al.*, 1998).

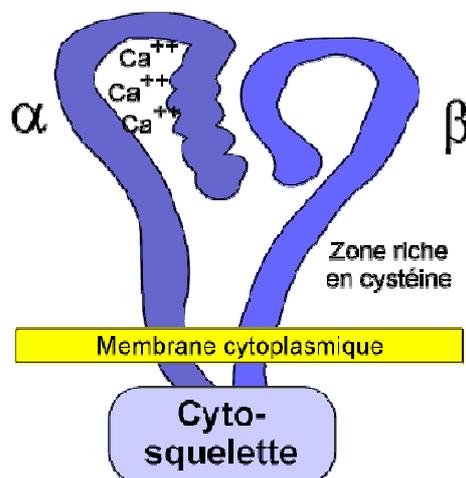


Figure B9 : Structure générale des intégrines.

Parmi celles-ci, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a un rôle substantiel dans la différenciation des cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins en voie d'angiogenèse. Elle se trouve être très fortement exprimée dans les néo-vaisseaux aussi bien au cours de la vasculogenèse que de l'angiogenèse inflammatoire ou tumorale. Elle est en revanche faiblement exprimée dans les vaisseaux matures.

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagit avec de nombreuses protéines de la matrice extra-cellulaire, comme la fibronectine, la thrombospondine, la vitronectine, le facteur Von Willebrand ou encore l'ostéopontine. La fixation se fait par un motif RGD (séquence arginine-glycine-aspartyl). Cependant, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagit également avec la protéine MMP-2 (Matrix Metallo Protease-2) qui intervient dans la dégradation de la matrice extracellulaire durant l'angiogenèse. L'interaction entre les deux protéines se fait par le domaine C-terminal de MMP-2 nommé PEX (Brooks *et al.*, 1996). L'angiogenèse induite expérimentalement sur la membrane chorioallantoïque de poulet peut être empêchée en utilisant une protéine PEX recombinante ne permettant pas l'interaction entre MMP-2 et l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Brooks *et al.*, 1998). La relation entre les deux protéines a ainsi été rapidement admise comme une condition indispensable au déroulement de l'angiogenèse.

L'activation du récepteur aux facteurs de croissance des vaisseaux sanguins VEGFR-2 nécessite l'intervention de la protéine $\alpha_v\beta_3$. Ce récepteur qui commande en partie l'activité mitogénique des cellules endothéliales ne peut effectivement être phosphorylé, et donc activé que si celles-ci adhèrent à la vitronectine par l'intermédiaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Soldi *et al.*, 1999).

Enfin, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été décrite comme étant un ligand du récepteur β au PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes) (Borges *et al.*, 2000). L'interaction du récepteur avec le domaine cytoplasmique β_3 de l'intégrine entraîne une augmentation de l'activité tyrosine kinase et de la transduction d'un signal cellulaire aboutissant à l'expression des gènes favorisant la migration et la prolifération cellulaire au moment du processus angiogénique.

I- 1 - 2 - 1 - 6 - Les marqueurs de l'angiogenèse

Le détail de la néo-vascularisation sanguine ne peut être pris en considération totalement sans qu'il soit possible d'accéder à des molécules spécifiques, connues et détectables, permettant de la qualifier ou de la quantifier à un moment déterminé. Des marqueurs exprimés exclusivement par les cellules de l'endothélium de ces vaisseaux sont des outils indispensables à la compréhension, l'interprétation et la résolution de l'angiogenèse tumorale.

CD34 est une intégrine de la famille des sialoglycoprotéines, encore appelée sialomucine, qui est exprimée par toutes les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins. Des isoformes de CD34 sont par ailleurs exprimés dans un grand nombre de tissus. Par exemple, dans le tissu hématopoïétique, il existe un isoforme de CD34 qui est exprimé par les progéniteurs de l'hématopoïèse, les cellules endothéliales et certaines cellules du stroma. Cette protéine est impliquée dans le contrôle de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Healy *et al.*, 1995).

CD31 ou PECAM 1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule) est exprimée à la surface des endothéliums vasculaires sanguins et des polynucléaires. Cette intégrine est un récepteur d'adhérence au collagène impliqué dans la liaison et l'agglutination plaquettaire à l'endothélium sous-jacent. Les plaquettes, qui se fixent au niveau d'un site vasculaire endommagé sont activées, initient la sécrétion du contenu des granules avant la coagulation. Ce marqueur est considéré comme l'un des marqueurs de choix de l'endothélium des vaisseaux sanguins.

Le récepteur aux facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux sanguins VEGFR-2 est également un bon moyen de caractériser ces structures. Cependant, la spécificité de cette protéine est mise en cause du fait de son expression dans d'autres tissus et organes. Elle ne peut par conséquent pas être considérée comme un marqueur idéal et est généralement utilisée pour confirmer les résultats obtenus avec d'autres marquages.

Tie 2 est un marqueur spécifique des cellules endothéliales et de leurs précurseurs. Il s'agit d'un récepteur sensible à l'angiopoïétine. Son activation est à l'origine de la libération

de PDGF et de HB-EGF, et par suite de la migration des cellules mésenchymateuses vers les cellules endothéliales, avant leur différenciation en péricytes et cellules musculaires lisses.

La neuropiline 1 (Nrp1) est un co-récepteur du VEGF. Elle participe à l'induction mitogénique des cellules endothéliales vasculaires. L'inactivation du gène de la neuropiline 1 provoque une létalité embryonnaire et un développement anormal du système cardiovasculaire chez le poulet (Moyon *et al.*, 2001). Cependant, son implication dans d'autres processus biologiques, comme la neurogenèse, ne permet pas de considérer cette molécule comme un marqueur très spécifique de l'endothélium des vaisseaux sanguins.

eNOS est une protéine membranaire des cellules endothéliales localisée au niveau de l'appareil de Golgi et de microdomaines plasmiques appelés cavéoles. Elle permet la synthèse de monoxyde d'azote (NO) par les cellules de l'endothélium des vaisseaux. En effet, le monoxyde d'azote est un médiateur très important de nombreuses fonctions du système cardiovasculaire.

La P-sélectine ou CD62P, glycoprotéine de la membrane des granules, est exprimée à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales lors de leur activation. Elle tient un rôle dans l'extravasation des leucocytes vers les sites d'inflammation. Ce marqueur immunologique est quelquefois utilisé pour la détection des cellules endothéliales.

I - 1 - 2 - 2 - La lymphangiogenèse

I - 1 - 2 - 2 - 1 - Définition et caractéristiques générales

D'une manière comparable au processus angiogénique, les tumeurs ont la capacité d'induire la formation de néo-vaisseaux lymphatiques en direction du tissu tumoral, à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène de lymphangiogenèse tumorale est à l'origine d'une amélioration des conditions du développement tumoral et d'une potentialisation de la dissémination des métastases dans de nombreux types de cancers, comme les cancers du sein, du poumon, des testicules, du col utérin, de la sphère ORL ou encore les mélanomes (Swartz *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2002).

Les connaissances actuelles concernant la lymphangiogenèse sont en pleine expansion depuis quelques années mais accusent cependant un retard important en comparaison avec celles relatives à l'angiogenèse. Cette circonstance est notamment la conséquence de la découverte tardive de molécules permettant l'identification, et par conséquent l'étude, des structures qui interviennent dans le fonctionnement et la physiologie du système lymphatique.

I - 1 - 2 - 2 - 2 - Lymphangiogenèse et progression tumorale

Le réseau des vaisseaux lymphatiques intervient dans les échanges entre les cellules tumorales et le milieu environnant en constituant une interface entre les cellules et le sang. En effet, l'approvisionnement des cellules en nutriments, qu'elles soient tumorales ou non, ne se fait pas directement par le sang : du plasma s'infiltré continuellement entre les cellules, constituant la lymphe interstitielle qui baigne les tissus et assure le transport intermédiaire des nutriments jusqu'aux cellules. Ces échanges sont bidirectionnels et permettent également l'évacuation des déchets du métabolisme cellulaire. Cette détoxification du milieu péri-tumoral est indispensable à la croissance optimale des tumeurs dont le métabolisme prolifératif est fortement producteur de résidus dénaturés, finalement canalisés dans les voies lymphatiques avant leur élimination via la circulation sanguine (Saharinen *et al.*, 2004).

Les cellules cancéreuses traversant un ganglion lymphatique y sont généralement séquestrées. Elles sont alors détruites mais peuvent, dans certaines circonstances, s'y développer, formant ainsi un foyer tumoral secondaire. C'est souvent le cas dans les cancers du sein où le ganglion sous-axillaire constitue généralement le premier relais métastatique. Dans de tels types de cancer, les vaisseaux lymphatiques peuvent être altérés lorsque la tumeur exerce une compression gênant la circulation lymphatique. On peut alors déplorer l'apparition d'un lymphoedème autrefois souvent à l'origine d'un gros bras.

Le premier ganglion concerné par un éventuel envahissement axillaire issu d'une tumeur primitive est le ganglion sentinelle. L'étude histologique après biopsie de ce ganglion en cas de doute est donc théoriquement prédictive de celle de l'intégrité de la chaîne ganglionnaire. Des techniques de marquage du ganglion sentinelle destinées à le localiser puis à l'exciser pour examen anatomopathologique ont été développées afin de préciser certains diagnostics. Ainsi, pour la localisation du ganglion sentinelle par utilisation d'un colorant

bleu, il est défini comme étant le ganglion marqué le plus proche du bord du colon ou le ganglion situé à l'extrémité d'un canal lymphatique coloré même si le ganglion n'est pas bleu (Giuliano *et al.*, 1997, Taback *et al.*, 2002). Pour le marquage par radio-isotopes, le ganglion sentinelle est défini comme celui dont la radioactivité est dix fois supérieure aux autres (Cox *et al.*, 2000). En utilisant ces techniques, il a été mis en évidence à la suite du prélèvement de 60 ganglions sentinelles sur 42 patients, que lorsque le ganglion sentinelle est négatif après analyse histologique classique (hématoxyline-éosine) et cytokératine immunohistochimie, la probabilité qu'un autre ganglion soit envahi est inférieure à 0,1% (Turner *et al.*, 1999).

Par ailleurs, la recherche du ganglion sentinelle, premier relais de drainage lymphatique des tumeurs colorectales, puis son analyse anatomopathologique, ont permis de déterminer une sous-classe de patients à risque de récurrence, sans répercussion sur le geste chirurgical. La localisation est réalisée en per-opératoire, après ouverture du péritoine et injection en sous-séreux en péri-tumoral de 1 cm³ de bleu de Patenté. Le colorant est capté puis drainé par les capillaires lymphatiques jusqu'au ganglion sentinelle qui est prélevé puis soumis à une analyse (histologique et) immuno-histologique (Braat *et al.*, 2004).

Au cours du développement tumoral, on constate généralement une augmentation de la vascularisation péri-tumorale. Au niveau des voies lymphatiques, il est couramment observé un accroissement significatif de la longueur et du diamètre des vaisseaux ainsi que l'apparition de nouvelles ramifications vasculaires. Cependant, les tumeurs possèdent rarement un système vasculaire lymphatique intrinsèque, mais plus généralement des vaisseaux dilatés dans le stroma péri-tumoral, pénétrant occasionnellement en périphérie dans la tumeur. Par ailleurs, il est désormais établi que les vaisseaux lymphatiques participent à la propagation tumorale en constituant une voie privilégiée de la dissémination métastatique (Pepper *et al.*, 2003). L'augmentation du nombre et du diamètre des ramifications lymphatiques à proximité des tumeurs correspond à une forme de potentialisation de la dissémination des métastases.

La pénétration des cellules cancéreuses des espaces péri-ductaux à travers la paroi des vaisseaux lymphatiques s'effectue par diffusion au travers des béances offertes par les sinus lymphatiques ou par digestion protéolytique de la fine matrice des vaisseaux. Les cellules cancéreuses sont alors véhiculées par le flux liquidien généralement jusqu'à leur arrivée dans des ganglions lymphatiques, avant de rejoindre la circulation sanguine par l'intermédiaire du

canal thoracique. Ils peuvent également former des micro-embols obstruant les capillaires lymphatiques, rejoindre alors les tissus à proximité par dégradation protéolytique de la matrice vasculaire et coloniser de nouveaux territoires de l'organisme en formant des foyers tumoraux secondaires.

I- 1 - 2 - 2 - 3 - Caractère lymphophile des cancers

Certains cancers, comme les cancers du sein, du poumon, de la peau, des testicules, du col de l'utérus, de la thyroïde, ainsi que les tumeurs gastriques, ont un mode de dissémination métastatique qui s'effectue préférentiellement par l'intermédiaire des vaisseaux lymphatiques. Cette disposition est notamment favorisée par la présence de vaisseaux lymphatiques à proximité de la tumeur et la structure des vaisseaux lymphatiques. Quelques unes des caractéristiques du réseau lymphatique et des capillaires qui le composent permettent en particulier d'expliquer la promptitude des cellules métastatiques à rejoindre plus facilement le flux lymphatique que le flux sanguin.

Le premier paramètre est l'immense étendue du réseau lymphatique, qui irrigue absolument tous les territoires tissulaires, à la seule exception du cerveau, selon des ramifications qui investissent les moindres méandres de l'organisme.

Le second élément réside dans la structure même des capillaires lymphatiques. Ces micro-vaisseaux possèdent un endothélium extrêmement fin formé d'une couche unique de cellules aplaties bordée par une membrane basale interrompue voire inexistante. Leur paroi est plus souple que celle des capillaires sanguins. La dégradation de cet endothélium par les enzymes protéolytiques synthétisées par les cellules métastatiques est donc d'autant plus efficace. De plus, les capillaires lymphatiques présentent un diamètre plus important que les capillaires sanguins et offrent ainsi une surface de contact supérieure pour l'intrusion des cellules malignes. Par ailleurs, l'endothélium lymphatique est ponctué de jonctions intercellulaires lâches de type *maculae adherens* destinées à faciliter le captage de certaines macromolécules circulantes et qui constituent des portes d'entrées majeures pour les cellules métastatiques.

De plus, le flux liquidien à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques est significativement plus faible que celui du système sanguin, et la différence de pression en résultant pourrait favoriser d'une part la pénétrabilité à l'intérieur du réseau lymphatique, et d'autre part la potentialité de formation des micro-embols souvent à l'origine de foyers secondaires.

I - 1 - 2 - 2 - 4 - Cas particulier des lymphomes

Les lymphomes sont des cancers du système lymphatique. Il s'agit de pathologies relativement rares, dont les manifestations initiales sont l'apparition d'un ou plusieurs ganglions volumineux indolores, souvent dans la région du cou, des aisselles ou de l'aîne, avec parfois de la fièvre et des fatigues persistantes. Le diagnostic de certitude est réalisé par une biopsie suivie d'un examen histologique. Il permet en particulier de préciser le type du lymphome. Un bilan d'extension est toujours envisagé pour rechercher d'éventuelles diffusions dans le but d'affiner le traitement. Les lymphomes peuvent se développer à partir des lymphocytes B ou des lymphocytes T.

La survenue d'un lymphome est d'autant plus probable que l'individu dispose de défenses immunitaires affaiblies ; ainsi, dans le cas des patients séropositifs, l'apparition d'un lymphome est potentialisée par l'absence de réponses immunitaires efficaces. Ce type de cancer représente environ 3% de tous les cancers et peut survenir à tout âge.

I - 1 - 2 - 2 - 4 - 1 - Maladie de Hodgkin

Il s'agit d'un lymphome particulier mis en évidence pour la première fois par Thomas Hudgkin en 1832 et dont l'origine demeure à ce jour une énigme encore non résolue. Les circonstances selon lesquelles la transformation maligne se produit sont notamment discutées. Il ne semble pas que la maladie de Hodgkin soit d'origine héréditaire ni contagieuse. L'hypothèse d'une insertion virale est la plus communément admise.

Contrairement aux autres lymphomes, qui peuvent survenir à tout âge, le lymphome d'Hodgkin est une pathologie qui concerne plus particulièrement les jeunes adultes et les enfants mais qui peut intervenir également chez des individus après 50 ans. Le lymphome de Hodgkin demeure cependant considéré comme un cancer du sujet jeune. L'âge médian au

moment du diagnostic est de 39 ans environ chez la femme et de 31 ans chez l'homme. Ce type de lymphome frappe environ 62000 individus chaque année dans le monde. Il est fatal pour 25000 d'entre eux. En France, l'incidence de la maladie est de 1,7 pour la femme et de 2,4 pour l'homme, ce qui correspond à deux à trois nouveaux cas par an pour mille habitants.

Ce cancer se caractérise par la formation de cellules anormales, dites réticulaires monstrueuses, dénommées cellules de Reed-Sternberg. Les cellules de Reed-Sternberg sont des cellules de grande taille, à noyau segmenté, qui contiennent plusieurs nucléoles et dont la chromatine est finement réticulée. Dans environ 50% des cas, les cellules de Reed-Sternberg sont infectées par le virus d'Epstein-Barr.

Une extension de la maladie peut se produire soit par la voie lymphatique, soit par la voie hématogène. Le lymphome de Hodgkin se développe dans 65% des cas à partir des ganglions du médiastin, et s'étend ensuite par le canal thoracique vers le creux sus-claviculaire jusqu'au niveau cervical. Une extension hématogène peut également se produire par l'intermédiaire du canal thoracique qui rejoint la circulation générale et favorise la dispersion viscérale, pulmonaire ou hépatique. Une atteinte splénique est constatée dans 50% des cas. Ces localisations spléniques sont à leur tour le point de départ d'une extension vers la chaîne ganglionnaire lombo-aortique.

I - 1 - 2 - 2 - 4 - 2 - Lymphomes malins non hodgkiniens

Les lymphomes malins non hodgkiniens désignent un groupe hétérogène de proliférations monoclonales malignes de cellules des lignées lymphocytaires B et T, plus rarement des NK (natural killer), qui, bloqués à un stade de différenciation donné, sont à l'origine du développement de tumeurs au niveau des organes lymphoïdes, en particulier des ganglions. Le caractère hétérogène de ce type de cancer résulte de l'existence de nombreux types histologiques, de la localisation qui peut être ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, ainsi que de l'existence de formes locales de cancers alors que d'autres se développent sous forme diffuse.

Il s'agit de l'une des formes de cancer dont l'augmentation est la plus importante. Leur fréquence augmente d'environ 5% chaque année. La maladie concerne en tout premier lieu les

sujets âgés. On déplore une augmentation très importante de l'incidence de ces lymphomes chez les individus porteurs du virus du SIDA. Cependant, ces derniers ne représentent que 1% de tous les lymphomes malins non hodgkiniens recensés dans les pays occidentaux, ce qui est insuffisant pour interpréter l'augmentation générale de l'incidence de ces pathologies, dont les facteurs étiologiques sont encore mal connus. On ignore aujourd'hui quelle est la répercussion de facteurs environnementaux humains, comme l'utilisation abusive de pesticides et d'engrais chimiques, l'exposition aux solvants et autres teintures, la pollution atmosphérique dans la participation à l'induction de cette maladie.

I- 1 - 2 - 2 - 5 - Mécanisme moléculaire de la lymphangiogenèse tumorale

La formation des voies lymphatiques en réponse à une stimulation tumorale est assujettie à un certain nombre de régulations à l'origine de la transduction du signal lymphangiogénique. Ce processus est initié par l'activation du récepteur VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3) localisé sur la membrane plasmique des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques. Le récepteur VEGFR-3 est spécifiquement activé par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D (Vascular Endothelial Growth Factor-C/-D) (Aprelikova *et al.*, 1992), dont l'activation est sous la dépendance d'un clivage protéolytique réalisé par la plasmine (McColl *et al.*, 2003). Lorsque deux molécules de VEGF-C ou -D se fixent sur leur récepteur VEGFR3, il se produit au sein de la membrane cytoplasmique une dimérisation des monomères du récepteur.

Ce processus engendre un rapprochement des domaines à activité tyrosine kinase aboutissant à une transphosphorylation des domaines intra-cytoplasmiques des récepteurs. Les récepteurs VEGFR-3 phosphorylés deviennent alors capables de se lier à une protéine de couplage GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound protein 2), elle-même susceptible d'interagir avec une molécule messagère SOS. SOS se lie au complexe RAS-GDP inactif accolé à la membrane plasmique. Le remplacement de GDP (Guanosine 5'-DiPhosphate) par GTP (Guanosine 5'-TriPhosphate) permet la transformation en forme active RAF, amorçant une cascade de protéines kinases MEK (MAP/ERK Kinase). Ce processus aboutit à l'activation d'une protéine ERK (Extracellular signal Regulated Kinase) à l'origine de l'activation des facteurs de transcription nucléaires des gènes responsables de l'activité mitogène des cellules

de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques (Figure B10). Récemment, il a été mis en évidence que si les récepteurs VEGFR-3 sont exprimés en très grande majorité sur l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, certains récepteurs VEGFR-2 y sont également retrouvés et pourraient activer la transduction du signal lymphangiogénique par interaction avec le facteurs de croissance VEGF-A (Cross *et al.* 2003).

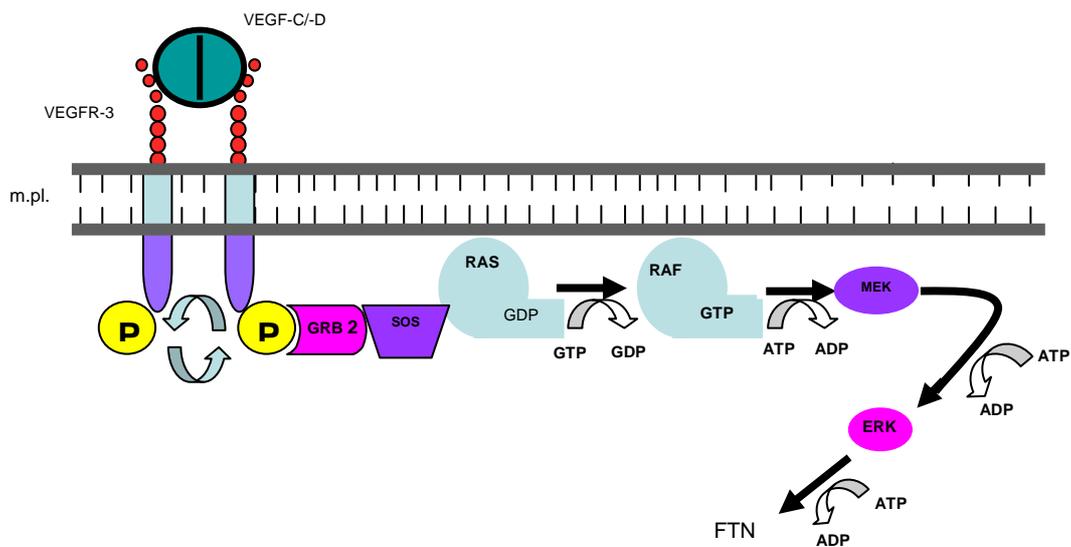


Figure B10 : Mécanisme d'activation de la lymphangiogenèse.

La transphosphorylation de deux monomères de récepteur VEGFR-3 permet l'activation d'une cascade de kinases impliquant les protéines RAS, RAF, MEK (MAP/ERK kinase) et ERK (extracellular signal regulated kinase). GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2 ; SOS : son of sevenless ; FTN : facteur de transcription nucléaire.

I - 1 - 2 - 2 - 6 - Les marqueurs de la lymphangiogenèse

Pour détecter et quantifier la néo-vascularisation lymphatique, il est indispensable de disposer de molécules spécifiques des vaisseaux lymphatiques. Aucune molécule ne constitue à l'heure actuelle un marqueur garantissant une fiabilité rigoureuse pour révéler la présence des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques. Cette particularité constitue l'un des écueils principaux limitant les investigations concernant le remodelage lymphatique en pathologie humaine.

Les récepteurs VEGFR-3, s'ils sont systématiquement mis en évidence au niveau des voies lymphatiques, sont aussi exprimés et détectés dans d'autres tissus ou organes tels que le cœur, les poumons ou les reins (Aprelikova *et al.*, 1992). Ils se trouvent être par ailleurs surexprimés dans de très nombreux organes au cours de l'embryogenèse. Le récepteur VEGFR-3 n'est donc pas un marqueur idéal de la lymphangiogenèse, d'une manière comparable à d'autres molécules comme LYVE-1 et la podoplanine, qui sont également exprimés au niveau des vaisseaux lymphatiques (Nisato *et al.*, 2004).

En effet, LYVE-1 (lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1) est un récepteur à un glycosaminoglycane, l'acide hyaluronique, constituant de la matrice extracellulaire, dont le transport s'effectue par les vaisseaux lymphatiques. Il est détecté sur la face externe de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques de nombreux tissus (Banerji *et al.*, 1999 ; Prevo *et al.*, 2001) Cependant, il est désormais avéré que son expression n'est pas restreinte aux seuls vaisseaux lymphatiques. LYVE-1 est détecté en particulier au niveau des cellules de Kupffer, macrophages localisés sur la face luminale des sinusoides hépatiques (Mouta Carreira *et al.*, 2001).

La podoplanine est une glycoprotéine de la membrane des podocytes localisée à proximité des récepteurs VEGFR-3 au niveau des petits vaisseaux lymphatiques. Il a été démontré que cette molécule peut être utilisée en tant que marqueur de l'endothélium des capillaires lymphatiques (Breiteneder-Geleff *et al.*, 1999). Sa fiabilité est cependant discutée.

Il existe un autre marqueur des néo-vaisseaux lymphatiques : il s'agit de la protéine Prox 1 (Prospero-related homeobox 1) qui tient un rôle fondamental dans le développement précoce du système nerveux central. Elle pourrait réguler l'expression génique et le

développement des neurones natifs post-mitotiques indifférenciés. Prox 1 est considérée comme un marqueur approximatif de la lymphangiogenèse (Hong *et al.*, 2004), car son expression a notamment été retrouvée au niveau cardiaque, hépatique et cérébral (Oliver *et al.*, 1993; Zinovieva *et al.*, 1996; Partanen *et al.*, 2001).

I - 1 - 3 - La dissémination métastatique

Les métastases sont des foyers tumoraux secondaires, issus de la tumeur primitive, et dont le développement autonome se réalise à distance du foyer initial. La disposition d'une tumeur primitive à disséminer ses cellules malignes à distance dépend principalement, d'une part de l'instabilité génotypique et donc phénotypique de ses cellules, et d'autre part de l'incapacité du système immunitaire à réaliser la destruction des cellules tumorales au cours du processus métastatique. Par ailleurs, les métastases sont généralement des structures de petite taille, parfois microscopiques, ce qui les rend difficilement détectables par les techniques actuelles aux stades précoces de leur évolution.

De plus, les tumeurs secondaires dérivées des métastases, bien que quelquefois diagnostiquées avant la tumeur primitive sont fréquemment inopérables, et ne permettent qu'un recours à la chimiothérapie, avec ou sans le bénéfice supplémentaire de la radiothérapie. La dissémination des métastases constitue actuellement l'écueil majeur du traitement des tumeurs solides qui représentent plus de 95% des cancers, tous types histologiques confondus.

I - 1 - 3 - 1 - Les étapes du processus métastatique

Dans un premier temps, des cellules se détachent du foyer tumoral primaire, et entament une dégradation des protéines constituant la lame basale de l'épithélium péri-tumoral grâce à l'action de métalloprotéases qu'elles synthétisent et sécrètent, jusqu'à pouvoir le traverser et envahir l'espace péri-tumoral. Les cellules cancéreuses prolifèrent alors au sein du tissu conjonctif constituant le stroma péri-tumoral, entraînant des modifications de la composition de la matrice extra-cellulaire, l'induction d'une néo-angiogenèse, la formation de fibroblastes particuliers.

Une réaction inflammatoire avec infiltration de cellules immunitaires apparaît localement. L'ensemble des modifications des structures préexistantes induites par les cellules cancéreuses aboutit à la formation d'un tissu conjonctif et inflammatoire, associé aux cellules tumorales, que l'on appelle le stroma. Le stroma fait partie intégrante de la tumeur et participe à sa biologie. Il comporte généralement des cellules conjonctives, fibroblastes ou myofibroblastes, des néo-vaisseaux sanguins, ainsi que des fibres extra-cellulaires de collagène et d'élastine. Le stroma constitue donc un tissu de soutien et de nutrition (Ahmad *et al.*, 1997) (Figure B11).

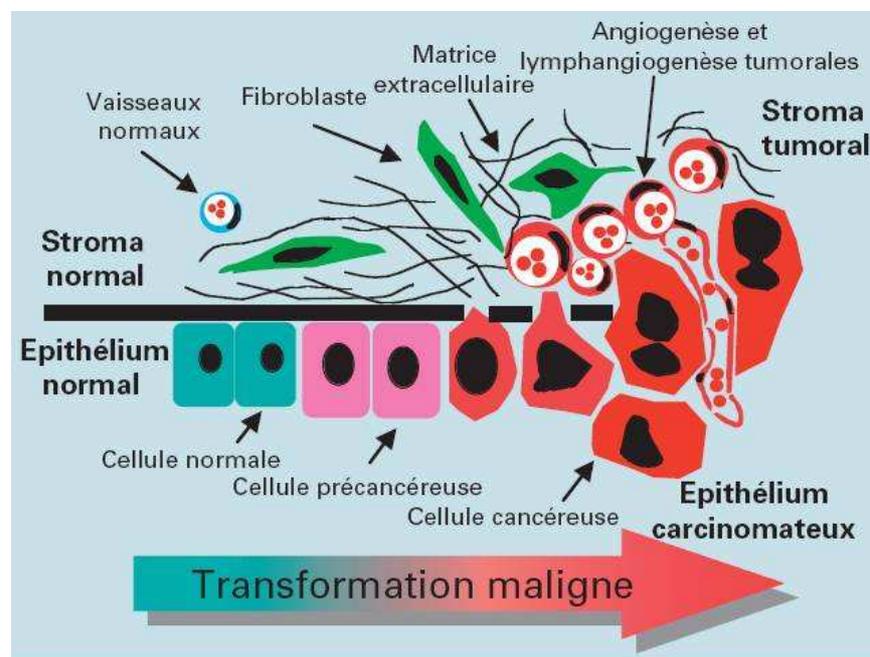


Figure B11 : Transformation du stroma au cours de l'évolution tumorale.

Les cellules, qui évoluent en milieu peu propice, bénéficient de mutations perpétuelles dans le but de leur permettre une adaptation à leur nouvel environnement. Certaines d'entre-elles sont capables de dégrader la fine membrane des vaisseaux sanguins et lymphatiques à proximité et parvenir à atteindre la circulation sanguine ou lymphatique.

Lorsqu'elles ont atteint un réseau vasculaire, qu'il soit sanguin ou lymphatique, les cellules sont véhiculées par le flux tout en poursuivant leur prolifération. Le complexe E-CDK2 des cellules cancéreuses étant continuellement actif, les cellules tumorales ne requièrent pas nécessairement d'ancrage pour poursuivre leur processus prolifératif. Elles peuvent alors former des agrégats de cellules tumorales. Le taux de mort cellulaire est généralement très important. Les cellules qui survivent sont celles dont la mutagenèse est la plus active, qui parviennent ainsi à s'adapter à un milieu encore différent et hostile. La plupart des cellules encore vivantes sont devenues immunorésistantes.

Les cellules s'immobilisent finalement dans des capillaires très fins où le flux liquidien est faible. L'arrêt des cellules dans la circulation est souvent associé à un micro thrombus, comprenant des plaquettes et des polynucléaires. Ces formations sont observées pendant quelques heures, puis elles sont généralement lysés par les enzymes fibrinolytiques, comme la plasmine, qui sont produits ou activés par les cellules tumorales. La digestion de la membrane basale de l'endothélium permet aux cellules cancéreuses de s'établir au sein du tissu conjonctif interstitiel sous endothélial et d'y croître, jusqu'à une taille approximative de 0,2 à 0,3 mm³. Pour poursuivre son développement au-delà de cette limite, la mise en place d'une néo-vascularisation nutritive est indispensable au nouveau foyer tumoral.

I - 1 - 3 - 2 - Les voies de dissémination métastatique

I - 1 - 3 - 2 - 1 - L'extension lymphatique

La dissémination des métastases par les voies lymphatiques représente la voie la plus récurrente de dissémination des carcinomes, c'est à dire des tumeurs cancéreuses qui affectent soit un tissu de revêtement comme l'épiderme ou les muqueuses, soit un tissu glandulaire. Les cancers les plus lymphophiles sont les cancers du sein, de la sphère ORL, du col de l'utérus, des poumons, de la peau et des testicules. L'extension par voie lymphatique est moins fréquente, bien qu'existante, dans le cas des sarcomes, c'est à dire des tumeurs malignes des tissus conjonctifs. Dans un premier temps, les cellules pénètrent à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques, où elles sont portées par le flux liquidien jusqu'au ganglion le plus proche dont elles envahissent le sinus périphérique. L'atteinte par les cellules cancéreuses d'un ganglion satellite entraîne généralement une réaction inflammatoire à l'origine de la destruction des

cellules tumorales. Cependant, il est à noter que la présence d'un ganglion lymphatique inflammé dans la zone de drainage lymphatique d'une tumeur n'est pas systématiquement indicative de la présence d'un envahissement métastatique ganglionnaire. En effet, le drainage des antigènes et des débris cellulaires peut induire différentes réactions immunitaires au sein du ganglion.

Les cellules métastatiques peuvent cependant traverser le premier ganglion et poursuivre leur cheminement vers les ganglions suivants. Elles peuvent également s'y installer et y demeurer dans un état de quiescence, et y proliférer ultérieurement.

Cependant, dans la majorité des cas, les cellules cancéreuses qui atteignent un ganglion lymphatique s'y multiplient et l'envahissent. Elles rejoignent d'abord la capsule ganglionnaire et provoquent une lymphangite, inflammation à l'origine d'oedèmes de compression plus ou moins importants. L'invasion progressive des voies lymphatiques et de leurs chaînes ganglionnaires se poursuit jusqu'à la libération des éléments du flux lymphatique contenant les cellules métastatiques dans la circulation générale par l'intermédiaire du canal thoracique. L'atteinte du ganglion sus-claviculaire, dernier relais ganglionnaire avant la circulation générale, est un indice fort d'une diffusion imminente du processus cancéreux à tout l'organisme.

La proximité des vaisseaux est suffisante pour permettre aux cellules métastatiques de rejoindre la circulation lymphatique. En effet, les vaisseaux lymphatiques ne pénètrent jamais en profondeur à l'intérieur du tissu tumoral, mais demeurent en bordure et tapissent généralement la masse cancéreuse, en s'insinuant légèrement et occasionnellement en périphérie dans la tumeur (Padera *et al.*, 2002).

I - 1 - 3 - 2 - 2 - L'extension hématogène

Les cellules cancéreuses peuvent atteindre cette voie soit secondairement par l'intermédiaire des voies lymphatiques qui aboutissent au réseau sanguin, soit directement par effraction des membranes vasculaires sanguines (Figure B12).

La voie hématogène directe est d'autant plus facile à atteindre que la paroi des vaisseaux péri-tumoraux est fine et la pénétration des cellules tumorales se fait régulièrement

par l'intermédiaire des petits capillaires sanguins. Par ailleurs il existe, particulièrement dans le cas des sarcomes, des lacunes vasculaires bordées de cellules tumorales, qui favorisent davantage encore l'accélération du processus de dissémination.

I - 1 - 3 - 2 - 3 - La dissémination directe par cavité naturelle

Elle peut se produire lorsqu'une tumeur maligne s'étend jusqu'à une cavité séreuse comme la cavité péritonéale, délimitée par le feuillet bordant les intestins ou la cavité pleurale, délimitée par les deux feuillets entourant les poumons, ou encore les espaces méningés et les cavités articulaires. Cet essaimage peut également intervenir à la suite de la rupture du tissu tumoral dans une cavité de l'organisme.

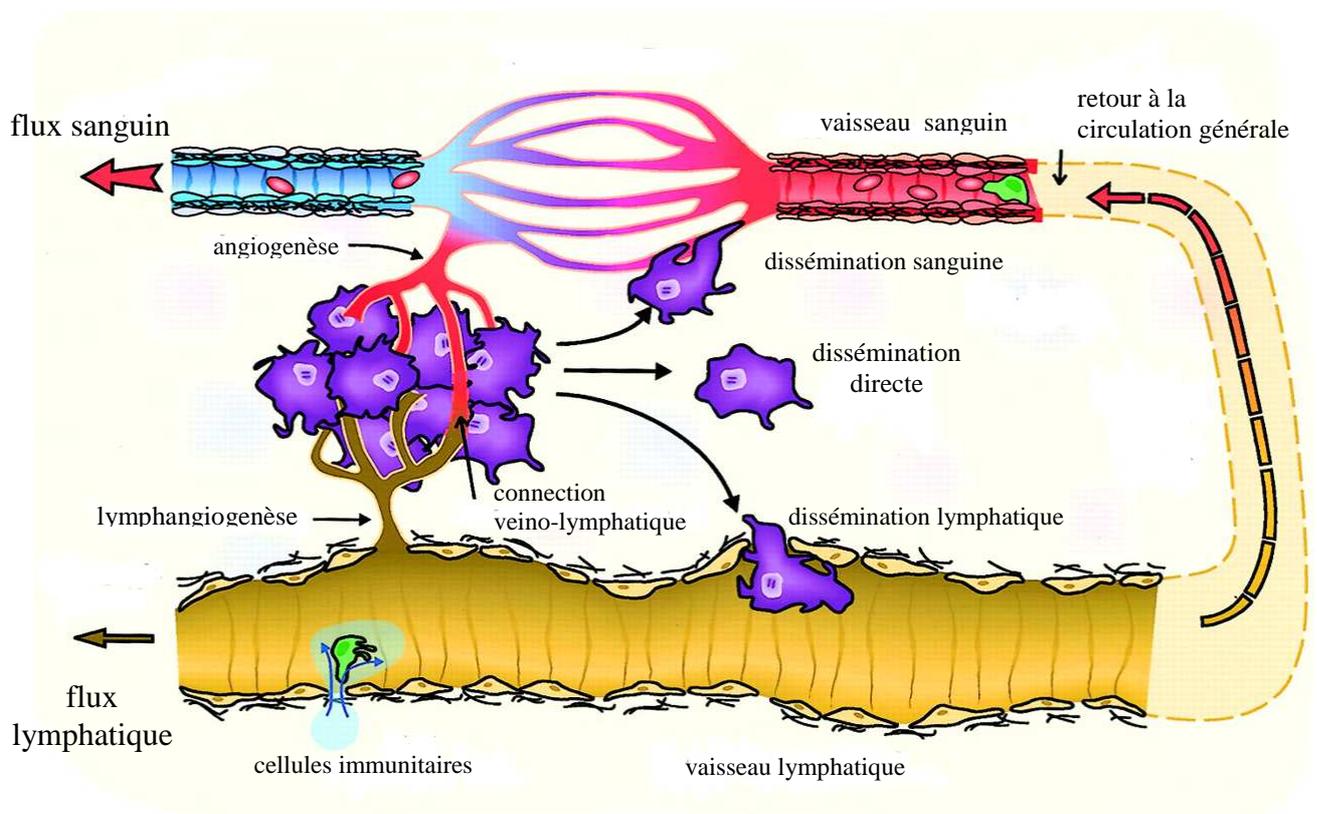


Figure B12 : Les différentes voies de la dissémination métastatique.

I - 1 - 3 - 3 - Différences entre les types tumoraux

Il est établi que chaque type de tumeur emprunte une voie de dissémination spécifique. Les cellules tumorales ne sont pas disséminées de manière aléatoire dans l'organisme. Elles se répartissent et se développent préférentiellement dans certains tissus ou organes en fonction de leur tissu d'origine. Ainsi, il est connu que la dissémination se fait plutôt par la voie hématogène dans certains cas et plutôt par la voie lymphatique dans d'autres. L'évolution des cellules métastatiques au cours de cette dispersion dans l'organisme répond à des contraintes biologiques qui aboutissent à des cheminements et des localisations secondaires récurrentes et prévisibles.

- Dans le cas du cancer colorectal, les cellules cancéreuses dégradent et traversent dans un premier temps la paroi intestinale et peuvent se loger dans la masse adipeuse péri-rectale ou dans les parois du bassin. Les cellules métastatiques peuvent parfois se propager à d'autres tissus et organes comme la prostate, le vagin, la vessie, les uretères, le pancréas, le foie, la région rétro-péritonéale ou encore l'épiploon. D'autres segments de l'intestin grêle ou du gros intestin sont éventuellement concernés par une atteinte s'ils se trouvent être proches de la tumeur initiale (August *et al.*, 1985 ; Chagpar *et al.*, 2001).

La diffusion se fait parfois par voie lymphatique, et de manière plus ou moins importante en fonction du degré de différenciation de la tumeur : lorsque la tumeur est indolente, l'atteinte des ganglions lymphatiques ne touche que 30% des patients, tandis que chez environ 80% d'entre eux, le système lymphatique est affecté si la tumeur est agressive. Il est par ailleurs connu que la diffusion dans le cas du cancer colorectal se fait aussi par la voie hématogène. Dans ce cas, le foie est le foyer métastatique le plus fréquent. Les poumons sont atteints dans un deuxième temps. Généralement, le cancer du côlon ne se propage pas à d'autres organes par voie hématogène sans avoir préalablement atteint le foie ou les poumons. Dans la plupart des cas, le foie est le seul organe touché (Brand *et al.*, 1996).

Que ce soit le système sanguin ou lymphatique qui est atteint, l'implantation des métastases peut survenir le long de la muqueuse interne de l'intestin, au niveau de l'espace intraluminal, et des cellules peuvent également atteindre la surface séreuse externe de

l'intestin vers laquelle les cellules issues de la tumeur se sont dirigées. Elles se nichent par ailleurs sur n'importe quelle surface de la cavité abdominale.

- Dans le cas du cancer de l'estomac, l'extension se fait directement au travers de la paroi stomacale en direction des organes adjacents et par la voie transcoelomique, vers la cavité péritonéale ou abdominale. La dissémination emprunte essentiellement la voie lymphatique et plusieurs ganglions peuvent être rapidement envahis (Borie *et al.*, 2000). C'est le cas des ganglions situés à proximité de l'estomac, de la rate et du foie dans un premier temps. Rapidement, l'extension peut se poursuivre jusqu'au bord gauche du cou, à la clavicule gauche, au niveau du ganglion de Troisier, ou à l'aisselle gauche, au niveau du ganglion d'Irish. Un envahissement ganglionnaire de cette nature signe généralement le début de la symptomatologie tumorale.

La dissémination amène à trouver des métastases au niveau de l'oesophage, de la cavité péritonéale, de la muqueuse de l'épiploon, du pancréas, du duodénum, de la rate, du colon, des ovaires, du rectum, des reins, des glandes surrénales, des poumons, des os et dans certains cas, du cerveau (Akiyama *et al.*, 1998 ; Huguier *et al.*, 2002).

- Dans le cas des sarcomes osseux, la dissémination des métastases se fait principalement par voie hématogène. La pénétration des cellules malignes dans la circulation sanguine se fait tôt dans l'évolution de la maladie, avant même la survenue des premiers symptômes. Elle est ponctuée par l'installation de foyers secondaires dans les poumons. Des tumeurs secondaires sont généralement retrouvées sur d'autres structures osseuses ou à quelques centimètres du foyer initial (Daffner *et al.*, 1997 ; Renard *et al.*, 1999).

- Les cancers du poumon ont une dissémination qui se fait essentiellement par voie lymphatique, mais parfois également par voie sanguine. En fonction de la localisation de la tumeur dans le poumon, le franchissement de l'organe, qui détermine l'évolution ultérieure de la maladie, est variable. Si la tumeur est située en surface du poumon, elle traverse la plèvre, et envahie le diaphragme ou la paroi thoracique. Si la tumeur a une position plus centrale dans le poumon, elle peut atteindre directement les ganglions lymphatiques hilaires, puis ceux du médiastin et autour de la trachée. Les vaisseaux lymphatiques sus-claviculaires, abdominaux et cervicaux sont des voies de dissémination fréquentes (Sugi *et al.*, 2005) .

L'extension par la voie sanguine se fait par l'intermédiaire de la riche vascularisation pulmonaire. Les cellules passent dans le sang et sont directement transportées vers le cœur qui expulse les cellules métastatiques dans tout l'organisme.

Pour le cas des cancers pulmonaires à petites cellules, les foyers tumoraux secondaires apparaissent le plus souvent au niveau du foie, de la plèvre, des ganglions lymphatiques, des os, du système nerveux central, des glandes surrénales et du tissu sous-cutané, mais peut se généraliser à tout l'organisme. Dans les cancers pulmonaires non à petites cellules, l'extension atteint souvent la plèvre, la paroi du thorax, les ganglions lymphatiques et le diaphragme lorsque la dissémination se fait par la voie lymphatique. Lorsque les cellules disséminent par voie sanguine, elles atteignent les os, les glandes surrénales, le foie, le cerveau et le péricarde (Sagman *et al.*, 1991 ; Fujisawa *et al.*, 1995 ; Stenbygaard *et al.*, 1999 ; Kagohashi *et al.*, 2003).

- Pour ce qui concerne les mélanomes, la proximité des structures vasculaires, sanguine ou lymphatique, détermine la voie de dissémination utilisée. Celle-ci, ainsi que la localisation de la tumeur initiale, détermine par ailleurs les localisations métastatiques. Dans tous les cas, les métastases peuvent être disséminées vers n'importe quelle partie du corps avec une prévalence pour les poumons, mais également les ganglions lymphatiques, le foie, le cerveau et la moelle épinière (Fornabaio *et al.*, 1988). La voie lymphatique est cependant la plus fréquente (Dadras *et al.*, 2003).

- La tumeur de la prostate peut voir son développement se faire selon différentes modalités. Dans certains cas, la tumeur se limite à l'organe en interne puis réalise une compression qui bloque l'urètre. En revanche, la tumeur peut parfois s'étendre aux tissus voisins, comme la vessie, le canal de l'urètre ou les vésicules séminales. Le rectum est plus rarement concerné car la membrane du fascia de Denonviller qui le sépare de la prostate constitue une barrière difficilement franchissable entre les deux tissus.

La dispersion des métastases par voie lymphatique génère d'abord un envahissement des ganglions se trouvant à proximité immédiate de la tumeur, puis de la région pelvienne où les ganglions iliaques externes, sacrés et lombaires sont principalement concernés. Finalement, les métastases colonisent généralement les os, en particulier ceux de la colonne

vertébrale, des hanches, des côtes et des membres (Geldof *et al.*, 1990). Par ailleurs, deux autres schémas de dissémination par les voies lymphatiques semblent pouvoir être distingués. L'un rejoint les ganglions pelviens et para aortiques, initiant la survenue de métastases à la vessie et au rectum, et parfois au niveau pulmonaire et hépatique. Dans le second cas, les ganglions pelviens ne sont pas affectés et la dissémination pourrait être relayée par une dissémination hémotogène en empruntant les veines vertébrales (Saitoh *et al.*, 1990).

Lorsque les métastases cheminent par la voie sanguine, le foie, les poumons et les reins sont le plus souvent les sites de localisations secondaires (Fabozzi *et al.*, 1995).

- Les tumeurs du rein se localisent dans un premier temps au seul organe, où elles se développent en interne. Elles peuvent par la suite s'insinuer à l'intérieur de la veine rénale et plus rarement de la veine cave inférieure (Tongaonkar *et al.*, 1995). Elles peuvent aussi traverser la capsule rénale et envahir le tissu adipeux péri-rénal, les glandes surrénales et le rein controlatéral. Les ganglions lymphatiques abdominaux qui drainent le rein sont fréquemment atteints mais la voie de dissémination principale n'est pas la voie lymphatique.

Dans un tiers des cas, au moment du diagnostic de la maladie, un ou plusieurs foyers secondaires ont déjà débuté leur développement. La dissémination, essentiellement hémotogène, génère des sites métastatiques au niveau du foie, des poumons, des os, du système nerveux central et des tissus mous (Mai *et al.*, 2001 ; Nieder *et al.*, 2004).

- Le cancer du sein est un cancer très lymphophile. Les voies lymphatiques constituent le mode de dissémination majeur. La chaîne ganglionnaire est rapidement envahie avec des localisations au niveau des ganglions sus-claviculaires et ceux de la région du cou, et un envahissement régional peut aboutir à l'atteinte de la paroi thoracique.

La dissémination des métastases provoque généralement l'apparition des foyers secondaires au niveau des poumons, du foie, des os ou encore du cerveau (Hawes *et al.*, 2001 ; Porter *et al.*, 2004).

- Dans le cas des cancers de la vessie, la progression est dans un premier temps locale. La tumeur traverse la paroi vésicale et s'infiltré dans les tissus adipeux de la zone péri-vésicale. L'extension débute ensuite par la transmission aux structures voisines comme la

prostate, l'utérus, le vagin, le rectum, le colon sigmoïde ou encore l'os pelvien. Une compression des uretères, de l'urètre prostatique et du col vésical signe généralement le début de la symptomatologie maligne.

Les voies lymphatiques favorisent une distribution qui inocule les ganglions de la région pelvienne jusqu'à ceux de la région abdominale.

La dissémination principale est hématogène et donne lieu à l'installation de foyers tumoraux secondaires au niveau hépatique, pulmonaire, cutané et osseux (Tabbara *et al.*, 1984).

- Les tumeurs ovariennes s'étendent localement aux tissus et organes voisins, les trompes de Fallope, l'utérus, la vessie, le péritoine de la région pelvienne, l'ovaire controlatéral ou encore le rectum, avant de rejoindre la circulation lymphatique principalement. L'introduction dans les vaisseaux lymphatiques se fait souvent dès le stade précoce de la maladie. Il s'accompagne d'un encombrement des voies lymphatiques pouvant aller jusqu'à l'obstruction partielle ou complète des vaisseaux se trouvant autour du sternum et sous le diaphragme, empêchant le drainage du liquide péritonéal qui s'accumule dans la cavité abdominale en provoquant une ascite (Kuwashima *et al.*, 1996 ; Cass *et al.*, 2001).

La propagation par la voie sanguine entraîne habituellement la survenue de métastases hépatiques, pulmonaires ou encore cérébrales (LeRoux *et al.*, 1991).

Dans ce type tumoral particulier, la dissémination des cellules métastatiques à d'autres territoires de l'organisme se fait surtout par essaimage péritonéal. Les cellules de la tumeur initiale se détachent, gagnent les cavités pelviennes et abdominales, et sont véhiculées par les liquides internes pour finalement trouver un ancrage et initier la formation d'un nouveau foyer. Les métastases s'installent le plus souvent au niveau des replis péritonéaux qui bordent et relient entre eux les viscères, la surface des parois intestinales, le péritoine, la vessie et l'utérus. Elles sont dans de nombreux cas véhiculées par le liquide péritonéal jusqu'au diaphragme qui se trouve être un site métastatique important. Il n'est pas rare que le liquide péritonéal traverse le diaphragme, atteigne les poumons et soit à l'origine d'un épanchement pleural (Mandai *et al.*, 1996 ; Akutagawa *et al.*, 2002).

- Les tumeurs qui se forment au niveau du col de l'utérus s'étendent naturellement aux tissus proximaux à partir du moment où les cellules ont franchi la paroi utérine. Elles peuvent alors gagner le vagin, la vessie, les trompes de Fallope, les ovaires et parfois le rectum.

La dissémination est essentiellement lymphatique. On distingue deux possibilités. Les cellules tumorales qui ont vu leur croissance se réaliser dans la partie supérieure de l'utérus ont tendance à s'insinuer dans les vaisseaux lymphatiques locaux et rejoindre ainsi les ganglions para-aortiques et les ganglions sus-claviculaires. Les cellules cancéreuses des parties médianes et inférieures de l'utérus pénètrent dans le flux lymphatique en direction des ganglions pelviens qu'elles envahissent.

La dissémination par voie sanguine, moins récurrente, aboutit à la survenue de métastases au niveau hépatique, pulmonaire, osseux et cérébral.

Un essaimage péritonéal est fréquent dans le cas des cancers du col utérin, par l'intermédiaire des fluides des cavités pelvienne et abdominale. Les foyers secondaires sont alors mis en évidence sur la surface des parois intestinales, le péritoine, la vessie et l'épiploon. La cloison inférieure du diaphragme est également au contact du liquide péritonéal et devient souvent un site privilégié de formation métastatique (Goff *et al.*, 1994 ; Huntsman *et al.*, 1994).

- Le cas des tumeurs hépatiques révèle l'envahissement de l'organisme à partir d'un organe extrêmement vascularisé assujéti à l'échappement des cellules malignes. Dans un premier temps, la tumeur peut se développer sur une partie seulement du foie ou s'étendre à tout l'organe. La localisation de la tumeur entraîne une intrusion des ganglions lymphatiques locaux mais la dissémination se fait essentiellement par l'intermédiaire de l'abondante vascularisation sanguine qui entoure le foie.

Les localisations secondaires sont alors principalement observées au niveau de la veine hépatique et de la veine porte, sur le diaphragme, les poumons, l'estomac, les glandes surrénales, les os et le cerveau (Si *et al.*, 2003 ; Ishii *et al.*, 2004).

- Les leucémies sont des cancers du système sanguin par définition. La distribution des cellules anormales se fait par conséquent par la voie hématogène. Il existe cependant, pour ce

cas particulier de cancer, une possibilité pour les cellules métastatiques d'être disséminées par les voies lymphatiques. Cette circonstance est due en particulier à la présence de nombreuses communications veino-lymphatiques et d'une relation extrêmement étroite entre les deux systèmes vasculaires. Il n'est pas exceptionnel ainsi de rencontrer des atteintes ganglionnaires chez des patients atteints par cette maladie.

Par ailleurs, la propagation à tout l'organisme est particulièrement accablante dans le cas des leucémies étant donné l'irrigation de tous les organes et tissus par le système vasculaire sanguin, siège du processus tumoral initial. Les foyers métastatiques surviennent généralement au niveau de la moelle osseuse, du foie, des poumons, de la rate, des ganglions lymphatiques, du système intestinal, des testicules et des méninges (Viadana *et al.*, 1978 ; Sharpe *et al.*, 1993).

Site primaire	Os	Poumon	Foie	Cerveau
Hépatome	8	20	x	
Œsophage	4-7	20-35	20-32	< 1
Estomac	5-10	20-30	35-50	1-4
Pancréas	5-10	25-40	50-87	1-4
Mélanome	30-40	60-80	70	40
Sein	50-85	60	45-60	15-20
Thyroïde	39	65	60	< 1
Hodgkin	50-70	50-70	60	20
Non-Hodgkin	25	30-40	51	1
Poumon	30-50	20-40	30-50	15-30
Colorectal	5-10	20-43	71	< 1
Ovaire	2-6	10	10-15	< 1
Utérus	5-12	30-42	15-30	< 5
Rein	30-50	50-75	35-40	7-8
Vessie	12-25	25-30	30-50	< 1
Prostate	50-70	13-20	13	< 2
Neuroblastome	80	25	70	25-50
Ostéosarcome	25	75	5	< 5

Tableau B2 : Incidence des métastases sur différents organes.

I - 2 - Les nouvelles thérapies anti-cancéreuses

I - 2 - 1 - La thérapie génique

On désigne par thérapie génique l'ensemble des approches permettant de transmettre une nouvelle information génétique au sein des cellules d'un individu dans le but d'apporter un bénéfice à une pathologie due au déficit ou au dysfonctionnement d'un gène essentiel. On peut distinguer la thérapie génique *ex vivo* et la thérapie génique *in vivo*.

I - 2 - 1 - 1 - Thérapie génique *ex vivo*

La thérapie génique *ex-vivo* consiste à prélever chez un patient certaines cellules puis à les traiter en y introduisant un gène corrigeant la déficience responsable de la pathologie. Ces cellules sont ensuite réadministrées au malade. Le gène peut être introduit dans les cellules de deux manières:

- par infection virale, où un virus porteur du transgène permet l'intégration du gène fonctionnel dans le génome des cellules cultivées.

- par micro-injection, c'est à dire par le remplacement du gène déficient par le transgène au moyen d'une micropipette. Ce procédé est relativement rapide, mais le taux d'intégration du transgène dans le génome cellulaire est généralement faible.

Les cellules dont le génome est corrigé par l'une ou l'autre de ces modalités sont réintroduites dans l'organisme du patient où elles se multiplient normalement (Ginn *et al.*, 2005). Cette technique ne peut cependant être appliquée que pour traiter des maladies génétiques n'altérant qu'un organe dont les cellules sont faciles à prélever, comme les cellules du sang ou de la moelle osseuse.

I - 2 - 1 - 2 - Thérapie génique *in vivo*

La thérapie génique dite *in-vivo* consiste à administrer directement au patient un vecteur contenant le gène d'intérêt. Cette méthode permet donc d'agir sur des organes dont on ne peut prélever les cellules. Cette thérapie nécessite cependant la mise au point de systèmes de transfert de gène utilisant des vecteurs biologiques tels que des virus modifiés ou des

liposomes. Elle permet d'envisager le traitement de pathologies héréditaires telles que la mucoviscidose, la myopathie de Duchenne ou la maladie de Tay-Sachs.

I - 2 - 1 - 3 - Thérapie génique et cancer

La mise au point de stratégies thérapeutiques par chimiothérapie, ainsi que l'utilisation des techniques de radiothérapie ont procuré ces dernières années des bénéfices considérables à la plupart des patients atteints de cancers. Les évolutions de ces traitements sont cependant encore trop fréquemment mises en échec par nombre de tumeurs qui échappent à ces solutions thérapeutiques, particulièrement du fait de leur adaptabilité aux traitements. Par ailleurs, le problème des tumeurs résistantes d'emblée aux chimiothérapie se pose. Pour ces raisons, la nécessité d'imaginer et de concevoir de nouvelles stratégies de lutte contre la maladie s'impose.

Les progrès des biotechnologies, le perfectionnement des biothérapies, l'évolution des connaissances sur le génome humain ainsi que sur les mécanismes de la tumorigenèse offrent de nombreuses nouvelles possibilités d'investigations. La recherche en matière de thérapie génique semble proposer une approche particulièrement adaptée à une appréhension innovante du problème du cancer, et génère désormais des protocoles pré-cliniques et cliniques (Rousseau *et al.*, 2003 ; Dudley *et al.*, 2005).

Plusieurs approches de thérapie génique peuvent être envisagées. Certaines ciblent directement les cellules tumorales, d'autres permettant la réduction de la vascularisation tumorale ou encore l'amélioration de la réponse immunitaire anti-tumorale.

I - 2 - 1 - 3 - 1 - La thérapie génique par gène suicide

L'objectif de cette stratégie est l'activation spécifique d'une prodrogue non toxique en drogue cytotoxique uniquement au sein des cellules tumorales. Le principe est de transférer *in vivo*, dans les cellules tumorales un gène codant une enzyme normalement absente du patrimoine des cellules. Cette enzyme a la capacité de transformer la prodrogue non toxique en un métabolite toxique.

Le système le plus expérimenté est celui de la thymidine kinase du virus de l'Herpès (HSV) de type 1 qui agit sur le ganciclovir comme prodrogue. Seul le ganciclovir triphosphate est actif, la première phosphorylation se faisant par la TK (thymidine kinase) virale. Le GCV-TP est un analogue nucléosidique de la guanosine qui s'incorpore aux chaînes d'ADN en élongation et induit l'apoptose (Beck *et al.*, 1995). Cette stratégie a été utilisée sur des modèles d'ostéosarcomes greffés chez le rat avec des résultats encourageants (Charissoux *et al.*, 1999), et fait désormais l'objet d'études en essai clinique (Colombo *et al.*, 2005).

I - 2 - 1 - 3 - 2 - Les stratégies anti-angiogéniques

Les limites des traitements cytotoxiques des cancers conduisent à envisager des approches alternatives aux traitements des tumeurs. L'angiogenèse est l'une des orientations de ces recherches (Bachelot *et al.*, 2003). En effet, les cellules de l'endothélium vasculaire, contrairement aux cellules cancéreuses, présentent peu ou pas de résistance naturelle ou acquise aux agents pharmacologiques. De plus, un effet basé sur la pharmacologie et non sur la toxicité permet d'envisager une meilleure tolérance.

I - 2 - 1 - 3 - 2 - 1 - L'angiostatine

L'angiostatine a été le premier composé endogène isolé susceptible d'inhiber spécifiquement le processus angiogénique. Il s'agit d'une protéine de 38 kDa formée de quatre sous-unités, dérivée du plasminogène, extraite à partir de cellules carcinomateuses pulmonaires en culture (carcinome de Lewis) (O'reilly *et al.*, 1994). Elle est synthétisée par les cellules tumorales. Son taux varie en fonction de la taille de la tumeur et diminue considérablement après l'ablation de celle-ci. L'angiostatine a pour principal effet d'induire spécifiquement aux cellules de l'endothélium des vaisseaux un caractère réfractaire vis à vis des stimuli angiogéniques.

L'angiostatine, qui inhibe spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales, induit également la dormance des cellules métastatiques en régulant la balance entre la prolifération et l'apoptose de ces cellules. Il a été démontré que l'administration systémique d'angiostatine humaine pouvait être à l'origine d'une inhibition significative de la croissance de trois types de carcinomes humains et murins chez la souris. Il a également été mis en

évidence qu'une inhibition quasi complète de la croissance tumorale avait pu être obtenue sans qu'il ne soit possible de détecter aucune forme de toxicité ou de résistance. L'utilisation de cette molécule endogène a permis pour la première fois d'obtenir la régression de carcinomes humains à l'état d'îlots microscopiques latents en réalisant un blocage prolongé de l'angiogenèse (O'reilly *et al.*, 1996 ; Boehm *et al.*, 1997).

I - 2 - 1 - 3 - 2 - 2 - L'endostatine

L'endostatine est une protéine de 20 kDa issue d'un hémangio-endothéliome de souris. Elle correspond à la fraction C-terminale du collagène XVIII (O'reilly *et al.*, 1997). Le collagène XVIII est un constituant de la matrice extra-cellulaire des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et ne possède pas, sous sa forme non clivée, de propriétés antiangiogéniques. Il a été mis en évidence que l'injection systémique de 20 mg/kg/jour d'endostatine recombinante chez des souris porteuses d'un implant tumoral (carcinome pulmonaire de Lewis, fibrosarcome T241, hémangio-endothéliome ou mélanome B16F10) pouvait induire, après 15 jours de traitement, une inhibition complète de l'angiogenèse et une régression supérieure à 90% de la tumeur primaire et des métastases. De plus, aucun signe de résistance ou de toxicité aspécifique n'est apparu au terme de 25 jours de traitement (Boehm *et al.*, 1997).

Le mécanisme de clivage du collagène XVIII à l'origine de la libération de l'endostatine est initié par la sécrétion de L cathepsine, d'élastase et de métalloprotéinases de la matrice par les cellules endothéliales activées. Ces enzymes protéolytiques provoquent une rupture de la molécule de collagène XVIII dans sa partie C terminale. Cette région est constituée par un domaine de trimérisation, une partie centrale contenant les sites du clivage protéolytique et une région terminale de 22 kDa contenant l'endostatine.

La molécule d'endostatine bloque la phosphorylation induite par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) du résidu tyrosyl situé sur le récepteur Flk-1 (VEGFR-2) et empêche l'activation de ERK, p38 MAPK et p125 FAK des cellules de l'endothélium de la veine ombilicale chez l'homme. Elle empêche également la fixation de VEGF(165) au domaine extra-cellulaire du récepteur Flk-1 purifié. L'interaction directe entre l'endostatine et Flk-1 a par ailleurs été confirmée par chromatographie d'affinité (Kim *et al.*, 2002) et l'action

inhibitrice de l'endostatine a été vérifiée sur de nombreux modèles expérimentaux (Dutour *et al.*, 2005).

I - 2 - 1 - 3 - 3 - L'immunothérapie génique

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale s'accompagne de modifications qui la singularisent et en fait une cible potentielle pour le système immunitaire. Cependant, des mécanismes mis en place par la tumeur lui permettent d'échapper, partiellement ou totalement, à ce système de protection de l'organisme. Ils procèdent essentiellement de la variabilité antigénique et de l'immunogénicité tumorale ainsi que de l'interaction de la tumeur avec les effecteurs de l'immunité.

L'immunothérapie génique consiste à optimiser génétiquement la réponse immunitaire. Pour cela, plusieurs approches sont possibles : Elles consistent soit à chercher à modifier les cellules tumorales, soit à modifier les effecteurs de l'immunité.

On distingue l'immunothérapie active, dans laquelle les cellules tumorales sont prélevées puis irradiées avant d'être administrées de nouveau au patient de manière à stimuler sa réponse immunitaire, et l'immunothérapie adoptive ou passive : dans ce cas, ce sont les cellules effectrices de l'immunité qui sont modifiées *ex vivo*, ou des antigènes qui sont administrés au patient.

I - 2 - 1 - 3 - 3 - 1 - Amélioration de l'immunogénicité tumorale

Il est devenu possible techniquement d'amplifier l'immunogénicité des antigènes tumoraux. Ces structures sont en effet les cibles des lymphocytes T cytotoxiques dans les stratégies d'immunothérapie génique. L'identification des antigènes tumoraux spécifiques constitue donc une étape cruciale dans la potentialisation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette identification est réalisée par des systèmes autologues dans lesquels les lymphocytes T cytotoxiques sont capables de reconnaître les peptides associés aux molécules de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité.

Une meilleure définition indispensable des vaccins anti-tumoraux a été obtenue notamment grâce à l'utilisation d'un nombre défini d'antigènes tumoraux, ainsi qu'à la

caractérisation des peptides reconnus pour un antigène donné. Plusieurs peptides ont ainsi été identifiés, autorisant le développement de protocoles d'immunisation antitumorale basés sur leur injection. Cette technique a été améliorée en concevant des vaccins comprenant la totalité de l'antigène, soit sous la forme protéique, soit sous la forme de son ARNm, soit sous la forme du gène codant cet antigène.

Plus récemment, l'injection directe d'ADN « nu » par voie sous-cutané ou intramusculaire a permis d'obtenir une expression de l'antigène dans sa totalité, en évitant les problèmes relatifs aux réactions immunitaires anti-vectorielles. Cette pratique de transfert de gène conserve néanmoins le défaut de n'induire qu'une expression relativement discrète du transgène. Cette difficulté a été contournée en utilisant certaines séquences plasmidiques non codantes, enrichies en dinucléotides CpG non méthylés, qui favorisent le développement de la réponse immunitaire et améliorent le pouvoir immunogène de l'injection d'ADN.

La vaccination tumorale consiste à modifier les cellules tumorales de manière à leur induire l'expression d'un antigène particulier. Le principe de cette technique consiste à prélever les cellules tumorales chez un patient, puis de les mettre en culture et de les traiter dans le but de les modifier de telle sorte qu'elles soient susceptibles d'activer le système immunitaire après qu'elles aient été ré-injectées au patient (Rosenberg, 2001 ; Biagi *et al.*, 2002).

Cependant, il est désormais établi que même si les cellules tumorales expriment des antigènes capables de provoquer le déclenchement d'une réaction immunitaire, le caractère indispensable d'une co-stimulation pour obtenir une réponse immunitaire efficace apparaît de plus en plus évident. Une évolution récente consiste à transférer aux cellules tumorales des gènes codant des facteurs de co-stimulation comme Ox40, 4-1BB ou Light (Croft, 2003) (Figure B13).

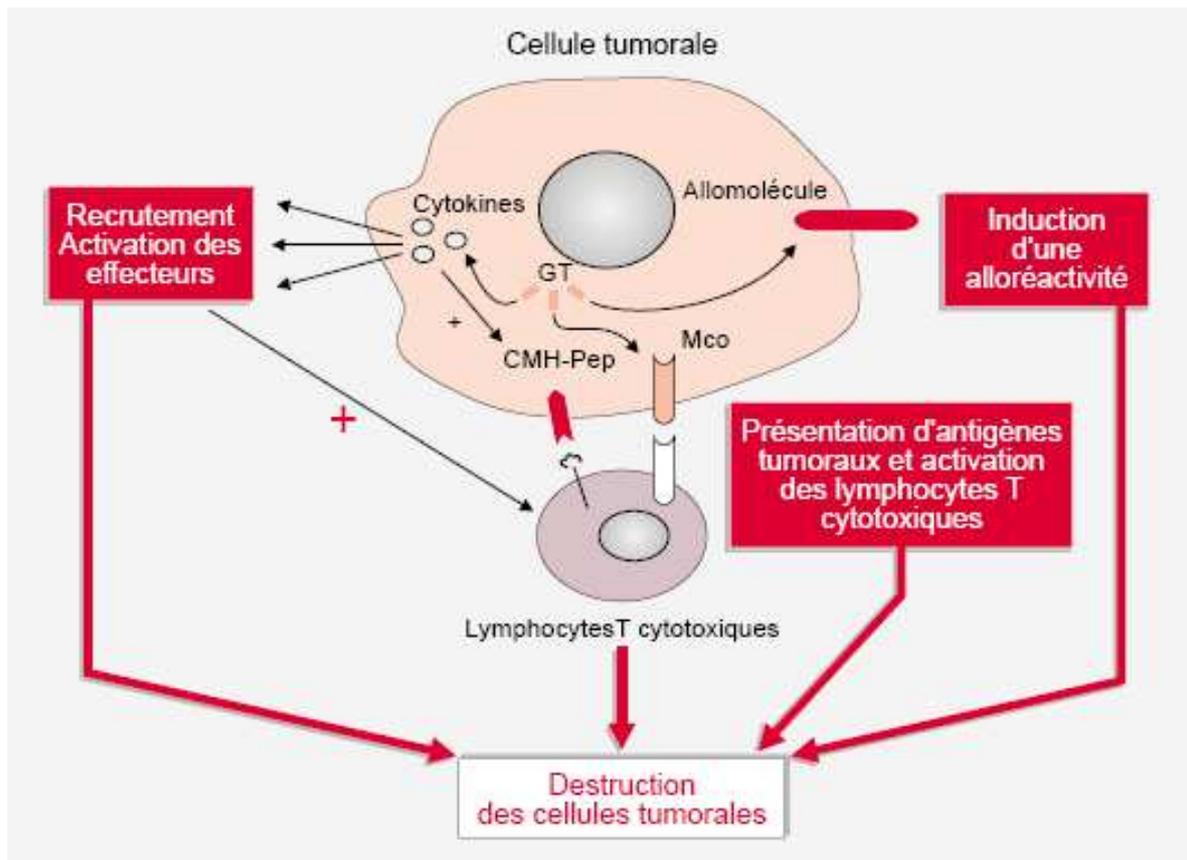


Figure B13 : Modification génétique des cellules tumorales.

Le transfert de gènes de cytokines permet soit d'améliorer la présentation d'antigènes tumoraux (CMH-Pep) aux lymphocytes T cytotoxiques, soit d'activer les effecteurs du système immunitaires (lymphocytes, monocytes, cellules dendritiques) qui peuvent amplifier la réaction immunitaire en produisant des cytokines et en présentant des antigènes tumoraux. Le transfert simultané de molécules co-stimulatrices permet l'activation des lymphocytes T reconnaissant les peptides tumoraux associés aux molécules de classe I. Il est également possible d'induire une réaction immunitaire dirigée contre les cellules tumorales en transférant le gène d'une allomolécule. GT : gène transféré ; Mco : molécule co-stimulatrice.

I - 2 - 1 - 3 - 3 - 1 - Stimulation des cellules immunitaires

Il s'agit d'une stratégie thérapeutique également connue sous le nom d'immunothérapie adoptive ou passive. Dans cette approche, ce sont les cellules effectrices de l'immunité qui sont modifiées *ex vivo* puis ré-administrées au patient. Cette fois encore, plusieurs possibilités sont envisageables.

Les lymphocytes T infiltrants les tumeurs sont des effecteurs cellulaires anti-tumoraux. Leur activation est augmentée de manière constitutive après transduction par le gène de l'interleukine 2 (IL-2). Leur potentiel anti-tumoral peut-être légèrement accentué par transfert du gène du TNF- α (Li *et al.*, 1999). L'utilisation des lymphocytes T infiltrants les tumeurs comme véhicule de gène thérapeutique est cependant limitée par les difficultés de leur isolement et de leur expansion *in vitro*.

Cependant, d'autres cellules du système immunitaire peuvent intervenir dans les stratégies d'immunothérapie adoptive. En particulier, l'utilisation des cellules dendritiques et des lymphocytes T cytotoxiques est à prendre en considération.

Il est désormais possible de modifier génétiquement les lymphocytes T de telle sorte qu'ils expriment des récepteurs chimériques spécifiques d'un antigène tumoral. Il leur devient alors possible de cibler précisément la tumeur et d'initier sa lyse. Cependant, en pratique, l'action du seul récepteur T chimérique est généralement insuffisante pour maintenir l'activation des lymphocytes T lorsqu'ils sont ré-administrés au patient. Une solution pourrait consister à modifier des lymphocytes T spécifiques du virus d'Epstein-Barr (EBV). Ces cellules prolifératives ont la capacité de lyser des cibles cellulaires tumorales positives pour certains des antigènes du virus. Cette stratégie a été utilisée dans le cas de lymphomes d'Hodgkin (Bollard *et al.*, 2004).

Une approche différente se développe de plus en plus. Elle repose sur l'utilisation des cellules dendritiques.

Les cellules présentatrices d'antigène ont pour principale caractéristique d'être capables de capter les antigènes et de les exposer aux cellules effectrices du système immunitaire. Ce rôle d'initiation de la réponse acquise est notamment tenu par les cellules

dendritiques qui permettent l'activation des lymphocytes T naïfs. Il est possible de les prélever, de les amplifier, de modifier leurs caractéristiques génétiques de telle sorte d'induire une réponse anti-tumorale accrue, puis de les ré-injecter au patient. La modification peut être le résultat d'un transfert de gène de cytokine ou d'antigènes tumoraux. Contrairement à l'utilisation directe de peptides pour stimuler les cellules dendritiques, cette stratégie permet d'obtenir une expression prolongée des peptides antigéniques, de lever la restriction du complexe majeur d'histocompatibilité, ainsi que de cibler plus efficacement le CMH de classe I en conservant la possibilité de présenter des antigène par l'intermédiaire du CMH de classe II (Trefzer *et al.*, 2005).

I - 2 - 1 - 3 - 4 - La thérapie par récepteurs circulants

La plupart des processus physiologiques dont le fonctionnement est directement sous la dépendance de récepteurs membranaires, comme c'est le cas pour la lymphangiogenèse tumorale, sont susceptibles d'être inhibés ou entravés par des récepteurs circulants. Ce sont des structures protéiques qui reproduisent une partie ou la totalité du récepteur naturel et qui disposent d'une affinité de fixation avec le ligand suffisante pour être à l'origine d'une compétition avec ce dernier. Le ligand se fixe alors au récepteur circulant avant son interaction avec le récepteur cellulaire et la transduction du signal est réduite, d'autant plus que le récepteur circulant est capable de neutraliser le ligand.

Cette stratégie est susceptible de représenter un outil efficace pour inhiber certains processus associés au développement tumoral. La stratégie que nous avons utilisée pour la mise au point d'une nouvelle solution destinée à inhiber la lymphangiogenèse tumorale, et par conséquent, le développement tumoral et la dissémination métastastique, est basée sur l'utilisation de récepteurs circulants.

L'utilisation de cette technique a en outre montré une efficacité redoutable pour le traitement de certaines pathologies dont la résolution est, comme c'est le cas de la lymphangiogenèse tumorale, également basée sur l'inhibition de récepteurs membranaires. Un exemple particulièrement significatif est celui de l'Etanercept, dont l'utilisation clinique a permis depuis plusieurs années de solutionner efficacement de nombreux cas de polyarthrites rhumatoïdes. Plus récemment, des essais cliniques concernant l'utilisation de récepteurs

circulants inhibiteurs de l'angiogenèse, nommés VEGF-Trap, ont été mis en application pour interrompre efficacement le processus angiogénique associé à l'évolution tumorale.

- Les VEGF-Trap sont des récepteurs circulants anti-angiogéniques ciblant les récepteurs aux facteurs de croissance synthétisés et sécrétés par les cellules tumorales en réponse à l'hypoxie au cours de l'évolution tumorale. Ils sont conçus à partir de la séquence de liaison des récepteurs membranaires VEGFR-1 et VEGFR-2 dont ils reproduisent les sites d'interaction avec le ligand, c'est-à-dire les facteurs de croissance angiogéniques VEGF-A et VEGF-B principalement (Holash *et al.*, 2002).

Ces récepteurs solubles sont formés par les deux ou les trois domaines terminaux d'homologie aux immunoglobulines des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Certains reproduisent la séquence de l'un ou l'autre de ces récepteurs membranaires, d'autres sont conçus par la fusion de fractions VEGFR-1 et VEGFR-2 (Figure B14).

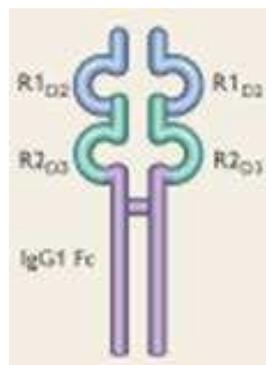


Figure B14 : Représentation schématique des récepteurs circulants VEGF-Trap.

Les récepteurs solubles VEGF-Trap peuvent être formés par les deux ou les trois derniers domaines d'interaction récepteur-ligand (VEGFR/VEGF). Certains sont formés à partir de la fusion entre un domaine de liaison de VEGFR-1 (R1D2) et un domaine de liaison de VEGFR-2 (R2D3). Une séquence IgG1-Fc est utilisée pour augmenter la stabilité du récepteur soluble dans la circulation sanguine.

Des essais cliniques de phase I ont été conduits chez des patients atteints de tumeurs solides. Les récepteurs solubles VEGF-Trap utilisés étaient des protéines hybrides formées par la fusion entre le domaine pré-terminal Ig-2 du récepteur VEGFR-1 et le domaine Ig-3 du récepteur VEGFR-2, de manière à élargir la spécificité de liaison du récepteur circulant aux deux récepteurs connus impliqués dans l'induction de l'angiogenèse tumorale.

38 patients âgés entre 23 et 75 ans ont été considérés dans cette étude. Les atteintes représentant des carcinomes rénaux, des tumeurs du côlon, des ovaires, des poumons et de la thyroïde principalement. Les récepteurs VEGF-Trap ont été administrés par voie sous-cutanée à la dose de 800 µg/kg une ou deux fois par semaine pendant dix semaines. Les premiers résultats ayant pu être observés indiquent une stabilisation de la maladie dans 50% des cas, sans effet secondaire majeur. Des essais cliniques de phase I sur l'administration des VEGF-Trap par voie intraveineuse est actuellement menés chez des patients atteints de tumeurs solides réfractaires ou de lymphomes malins non hodgkiniens.

- L'Etanercept est une protéine de fusion dérivée du récepteur p75 du facteur de nécrose des tumeurs (TNF). Il s'agit d'une molécule conçue par génie génétique. L'Etanercept est un dimère issu d'une protéine chimère génétiquement modifiée obtenu en réalisant la fusion entre le domaine de liaison extracellulaire du récepteur 2 humain au facteur de nécrose des tumeurs (TNFR2/p75) et le domaine Fc de l'immunoglobuline G1 humaine (Fc-IgG1)(Suffredini *et al.*, 1995 ; Weinblatt *et al.*, 1999) (Figure B15).

La molécule est constituée de 934 acides aminés et son poids moléculaire est d'environ 150 kilodaltons. L'activité de l'Etanercept a été initialement déterminée en mesurant sa capacité à neutraliser l'inhibition de la croissance des cellules A 375 médiée par le TNF- α . Ce médicament est utilisé seul ou en association avec le méthotrexate dans le traitement de nombreuses pathologies inflammatoires telles que les polyarthrites rhumatoïdes sévères, actives et évolutives de l'adulte, l'arthrite chronique juvénile polyarticulaire de l'enfant, le rhumatisme psoriasique, la spondylarthrite ankylosante et le psoriasis (Bathon *et al.*, 2000; Vignola *et al.*, 2002 ; Mease *et al.*, 2004 ; Wendling *et al.*, 2004).

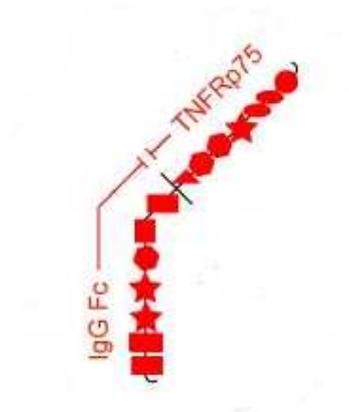


Figure B15 : Protéine de fusion humaine TNFRp75 (TNFR2) / Fc-IgG1 (Etanercept).

Le facteur nécrosant des tumeurs (TNF) est une cytokine dominante dans le processus inflammatoire de la polyarthrite rhumatoïde. Des taux élevés de TNF sont également retrouvés dans les membranes synoviales et les plaques de psoriasis des patients atteints de rhumatisme psoriasique, et dans le sérum et le tissu synovial des patients atteints de spondylarthrite ankylosante. Dans les plaques de psoriasis, l'infiltration par les cellules inflammatoires, y compris les cellules T, conduit à une augmentation des taux de TNF dans les lésions psoriasiques, comparativement aux taux observés au niveau des zones non atteintes de la peau. L'Etanercept est un inhibiteur compétitif de la liaison du TNF à ses récepteurs de surface inhibant ainsi l'activité biologique du TNF- α (Gudbrandsdottir *et al.*, 2004).

Le TNF et la lymphotoxine sont des cytokines pro-inflammatoires qui lient deux récepteurs distincts à la surface des cellules : les récepteurs du facteur nécrosant des tumeurs (TNFR) de 55 kilodaltons (p55) et de 75 kilodaltons (p75). Ces deux TNFR existent naturellement sous des formes membranaires et solubles. On pense que les TNFR solubles régulent l'activité biologique du TNF. Le TNF et la lymphotoxine existent principalement sous forme d'homotrimères, leur activité biologique étant dépendante de la réticulation des TNFR à la surface des cellules. Les récepteurs dimères solubles tels que l'Etanercept présentent une affinité plus marquée pour le TNF que les récepteurs monomères et sont des

inhibiteurs compétitifs beaucoup plus puissants de la liaison du TNF à ses récepteurs cellulaires (Murray *et al.*, 1997).

La majorité des atteintes articulaires de la polyarthrite rhumatoïde et de la spondylarthrite ankylosante, et des atteintes cutanées du psoriasis en plaques est médiée par des molécules pro-inflammatoires qui appartiennent à un réseau contrôlé par le TNF. Le mécanisme d'action supposé de l'Etanercept consiste en une inhibition compétitive de la liaison du TNF aux TNFR de la surface cellulaire : les réponses cellulaires médiées par le TNF sont bloquées en rendant le TNF biologiquement inactif.

L'Etanercept a été étudié chez 2680 patients atteints de polyarthrite rhumatoïde au cours d'essais cliniques en double aveugle. Ces expériences impliquent deux études contrôlées contre placebo (349 patients sous Etanercept et 152 patients sous placebo) et deux essais contrôlés versus traitement actif, un essai contrôlé contre traitement actif comparant Etanercept au méthotrexate (415 patients sous Etanercept et 217 patients sous méthotrexate) et un autre essai contrôlé versus traitement actif comparant l'Etanercept (223 patients), le méthotrexate (228 patients) et l'Etanercept associé au méthotrexate (231 patients). Le taux de sorties d'essais à la suite d'événements indésirables était la même dans les groupes traités par l'Etanercept et par le placebo; de plus, au cours du premier essai contrôlé contre traitement actif, la proportion d'abandon était significativement plus élevée dans le groupe méthotrexate (10 %) que dans le groupe Etanercept (5 %). Dans le second essai contrôlé versus traitement actif, le taux d'arrêt consécutifs à des événements indésirables était comparable dans les trois groupes de traitement, Etanercept (11 %), méthotrexate (14 %) et Etanercept associé au méthotrexate (10 %). 203 patients atteints de spondylarthrite ankylosante ont été traités par Etanercept dans 3 études contrôlées versus placebo en double aveugle. L'utilisation de l'Etanercept a également été étudiée pendant une période maximale de 6 mois dans 3 études contrôlées en double aveugle versus placebo chez 1084 patients atteints de psoriasis en plaques.

Dans les études cliniques en double aveugle comparant l'Etanercept au placebo, des réactions au site d'injection ont été les événements indésirables les plus fréquents chez les patients traités par l'Etanercept. Chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde dans les essais contrôlés contre placebo, les événements indésirables graves sont apparus à une

fréquence de 4 % parmi les 349 patients traités par l'Etanercept, contre 5 % des 152 patients sous placebo. Dans le premier essai contrôlé contre traitement actif, les événements indésirables graves sont survenus avec une fréquence de 6 % parmi les 415 patients traités par l'Etanercept, contre 8 % chez les 217 patients traités par le méthotrexate. Dans le second essai contrôlé versus traitement actif, le taux d'événements indésirables graves était similaire dans les trois groupes de traitement (Etanercept : 11 %, méthotrexate : 12 % et Etanercept associé au méthotrexate : 8 %). Chez les patients atteints de psoriasis en plaques et traités dans les essais contrôlés versus placebo, la fréquence des événements indésirables graves était estimée à environ 1 % des 933 patients traités par l'Etanercept et à 1 % des 414 patients traités par placebo.

Les effets indésirables les plus fréquents en essais cliniques chez l'adulte sont des réactions allergiques, des prurits, des réactions au site d'injection, des infections, des syncopes, des douleurs thoraciques et, dans certains cas exceptionnels, on déplore la survenue d'évènement graves tels des insuffisances cardiaques, de l'hypertension, des hémorragies gastro-intestinales, des tuberculoses et des tumeurs malignes (Moreland *et al.*, 1999; Flendrie *et al.*, 2003).

Notre travail a consisté en l'élaboration de récepteurs VEGFR-3 circulants destinés à neutraliser les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D activateurs de la lymphangiogenèse tumorale avant leur fixation sur les récepteurs VEGFR-3 membranaires. Cette stratégie anti-lymphangiogénique est essentiellement destinée à compléter les approches vasculaires des cancers principalement basées à l'heure actuelle sur l'inhibition de l'angiogenèse tumorale.

La thérapie par utilisation de récepteurs circulants est une approche récemment développée pour bloquer totalement ou partiellement certains processus pathologiques dont la transduction est basée sur l'interaction entre un récepteur membranaire et son ligand activateur. Elle est par conséquent applicable au processus lymphangiogénique associé au développement de certaines tumeurs, particulièrement depuis que ses mécanismes de régulations commencent à être dévoilés.

Cette stratégie thérapeutique est de plus en plus en clin à être astreinte à une forme de résistance comme c'est le cas pour la chimiothérapie.

L'utilisation de récepteurs circulants a par ailleurs été exploitée avec efficacité pour inhiber l'angiogenèse tumorale (VEGF-Trap). Il s'agit par conséquent d'une technologie particulièrement innovante qui présente la qualité particulière de proposer une approche spécifique des processus liés au développement de nombreux cancers. Le ciblage de la lymphangiogenèse tumorale est en effet considéré dans notre étude au niveau moléculaire, de telle sorte de permettre à terme la combinaison de traitements susceptibles d'agir à plusieurs niveaux, et ainsi compléter la diversité des traitements actuels, comme la chimiothérapie et la radiothérapie, ou d'autres traitements particulièrement innovants comme l'immunothérapie et la thérapie génique.

Selon ces considérations, nous avons réalisé la conception des récepteurs circulants anti-lymphangiogéniques, à partir de la région codante du gène VEGFR-3 humain, puis nous avons évalué l'incidence de l'utilisation de ces molécules sur la croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, avant d'estimer d'une part leur aptitude à inhiber la migration des cellules vasculaires lymphatiques vers le stimulus tumoral et d'autre part leur

capacité à contrarier l'organisation de ces cellules en formation vasculaires structurées et fonctionnelles.

II - Partie expérimentale

II - 1 - Matériels et méthodes

II - 1 - 1 - Culture cellulaire

II - 1 - 1 - 1 - Cellules CHO

Les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) sont des cellules ovariennes de Hamster chinois provenant de l'ECACC. Elles sont issues d'un sous-clone de la lignée parentale obtenue par Puck en 1957. Les cellules CHO sont des cellules adhérentes, à morphologie de type épithéliale, cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans du milieu de Ham F12 supplémenté par 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF, BioWhittaker, Verviers, Belgique), 2 mM de glutamine et une solution de pénicilline (100 µg/mL) / streptomycine (100 UI/mL). Elles sont cultivées jusqu'à 70 à 80% de la confluence maximale avant d'être remises en sous-culture à raison de 10000 à 30000 cellules/cm². Le détachement des cellules CHO de leur support de culture se fait au moyen de trypsine (0,05%)/EDTA (Life Technologies). L'opération de détachement des cellules par la trypsine se fait en réalisant un lavage du tapis cellulaire par un tampon phosphate salin stérile ou PBS (NaCl 140 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4) puis une incubation de 10 min à 37°C en présence de trypsine/EDTA. Les cellules dissociées sont centrifugées puis reprises dans des flacons de culture stériles à la densité voulue. Les cellules CHO peuvent être conservées à long terme sous forme d'aliquots de 5.10⁶ à 1.10⁷ cellules : après trypsination et centrifugation, elles doivent pour cela être reprises dans du milieu de culture complet contenant 20% de SVF décomplémenté et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde), avant d'être stockées à -80°C.

II - 1 - 1 - 2 - Cellules hTERT-HDLEC

Les cellules hTERT-HDLEC (human telomerase reverse transcriptase-human dermal microvascular endothelial cells) sont des cellules endothéliales lymphatiques extraites à partir des micro vaisseaux du derme d'origine humaine, ayant été transfectées par un rétrovirus contenant la région codante du gène humain de la transcriptase inverse de la télomérase. Cette lignée est caractérisée par une augmentation significative de la durée de vie du fait de l'intégration de la région codante du gène hTERT, réalisée par l'équipe de Nisato en 2004. Les cellules hTERT-HDLEC sont des cellules adhérentes présentant une morphologie allongée pouvant émettre de longues ramifications. Par ailleurs, ces cellules sont susceptibles de former des tubules sur matrice de collagène lorsqu'elles sont stimulées par certains facteurs de croissance. La culture est réalisée sur un support de gélatine à 1%, à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. La croissance optimale est obtenue en utilisant le milieu de culture EGM-2MV (Clonetics Cambrex) supplémenté par 5% de sérum de veau foetal décomplémenté, 0,4% de hFGF-B (human Fibroblast Growth Factor B), 0,1% de hEGF (human Epidermal Growth Factor), 0,1% de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), 0,1% de IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), 0,1% d'acide ascorbique, 0,04% d'hydrocortisone et 0,1% de gentamycine sulfate - amphotéricine B. Le détachement des cellules hTERT-HDLEC s'effectue de manière similaire à celui précédemment décrit pour les cellules CHO, au moment où les cellules se trouvent à 90% de la confluence maximale, en utilisant une solution de trypsine (0,025%)/EDTA (Gibco-Invitrogen). Les cellules en culture sont traitées par une solution d'hygromycine B à 25 µg/mL tout les cinq passages, pendant cinq jours.

II - 1 - 1 - 3 - Coculture verticale des cellules CHO et hTERT-HDLEC

Afin de démontrer que la protéine codée par les vecteurs recombinants est fonctionnelle et possède une activité inhibitrice sur la croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, des expériences de coculture verticale ont été réalisées (Figure M 1). Cette technique est destinée à faire passer les protéines sécrétées par les cellules CHO productrices des récepteurs circulants dans le milieu des cellules lymphatiques, sans qu'il n'y ait contact entre les deux lignées cellulaires.

Les cellules CHO transfectées par le système d'expression pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 normalement cultivées dans un milieu comportant un antibiotique de sélection (hygromycine B ; 250 µg/mL), sont placées dans le milieu de culture des cellules hTERT-HDLEC sans ajout d'antibiotique, afin de vérifier que les cellules CHO transfectées supportent les conditions de la coculture avec les cellules hTERT-HDLEC, sans perte d'expression du transgène. Des cellules CHO non transfectées, ainsi que des cellules CHO transfectées par le plasmide vide sont utilisées comme témoin.

Les cellules hTERT-HDLEC sontensemencées dans des plaques de culture 24 puits à la densité de 10000 cellules par puits, au temps T₀, et maintenues dans des conditions de culture normales pendant 48 heures.

Les cellules CHO transfectées sontensemencées dans des inserts de co-culture (Millicell culture plate insert 0,4 µm) à la densité de 5000 cellules par insert, dans 0,5 mL de milieu de culture. Les inserts sont alors placés au contact des cellules hTERT-HDLECensemencées 24 heures auparavant dans les puits des plaques de culture.

La coculture est réalisée sur une période de 15 jours. Le milieu est changé tous les trois jours par aspiration. Les cupules de coculture sont remplacées tous les 4 jours par de nouveaux inserts contenant des cellules CHO transfectées, à la densité de 5000 cellules par unité.

Les comptages sont effectués tous les jours. La mortalité est estimée par le test d'exclusion au bleu de Trypan à 0,1 %.

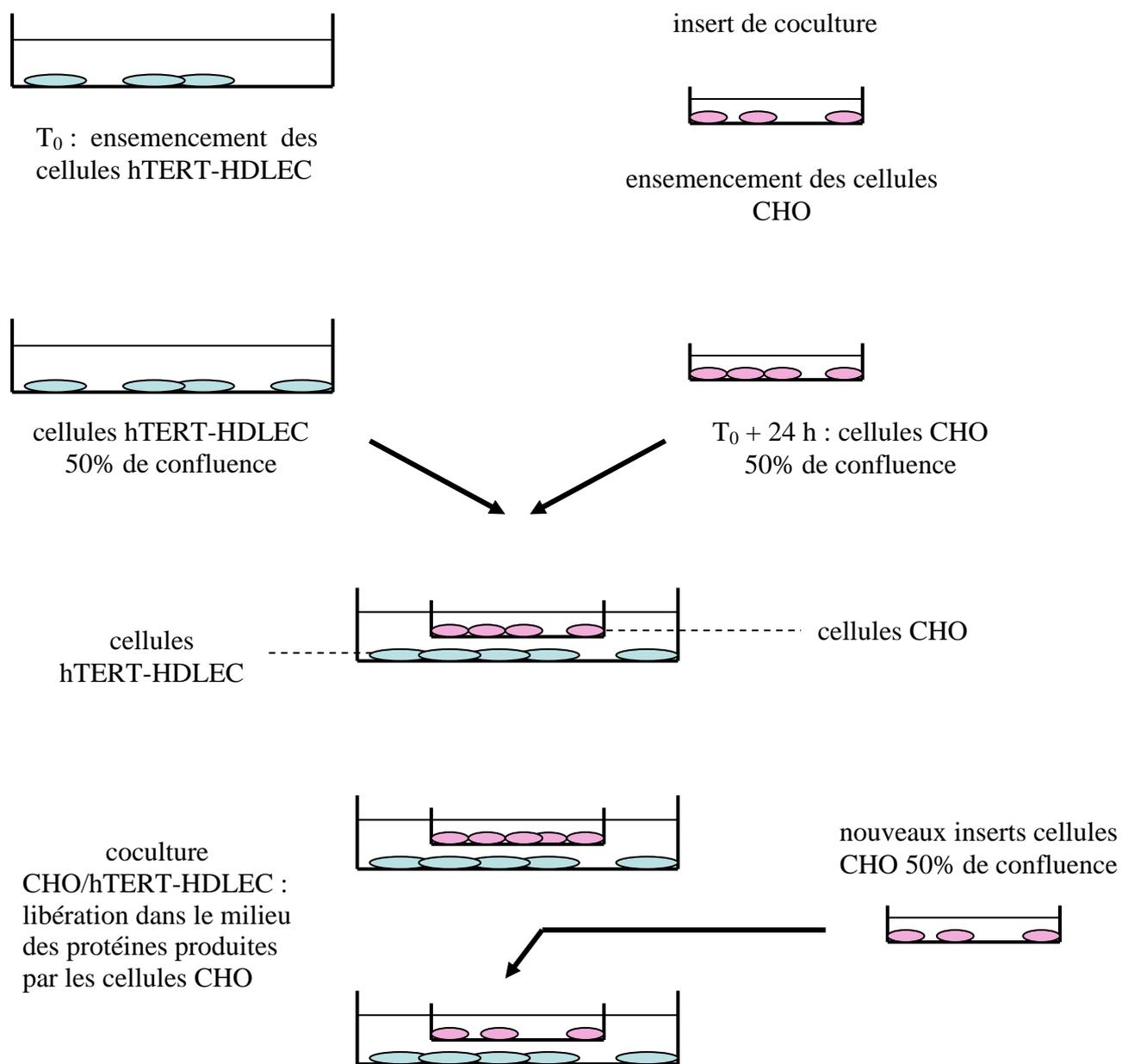


Figure M1 : Principe de la coculture verticale.

II - 1 - 1 - 4 - Courbes de croissance

La croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques humains (hTERT-HDLEC) est estimée sur une durée de 15 jours. Les cellules sont initialement ensemencées à la densité de 10000 cellules par puits dans des plaques 24 puits, dans 0,5 mL de milieu de culture. Le comptage des cellules est effectué tous les jours selon le protocole suivant : la cupule de coculture est retirée du puits et le milieu est éliminé. Le tapis cellulaire est rincé deux fois au moyen d'une solution de PBS 1X (NaCl 140 mM, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4), puis soumis à l'action d'une solution de trypsine-EDTA (200 µL/puits) pendant 2 minutes. Les cellules détachées du support sont récupérées dans du milieu complet qui neutralise l'action de la trypsine, puis centrifugées pendant 10 minutes (1500 rpm). Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans du milieu de culture. Quatre aliquots de 50 µL par puits sont prélevés et mélangés à 50 µL de bleu de Trypan. La numération est réalisée en utilisant une lame de Malassez, le nombre de cellules par cm² est estimé à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{X_{BT} \times D}{S} \quad \text{cellules par cm}^2$$

X_{BT} : Nombre de cellules excluant le bleu de Trypan (cellules vivantes)

D : Facteur de dilution des cellules dans le bleu de Trypan

S : Surface du puits en cm² ; Pour le cas des puits de plaque 24 puits, cette valeur est égale à 1,88

II - 1 - 1 - 5 - Test d'inhibition de la chimiotaxie

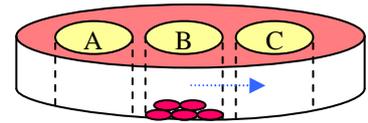
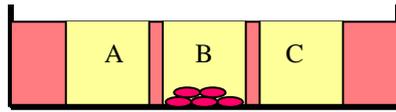
L'objectif de cette étude est de déterminer dans un premier temps la capacité de migration orientée des cellules endothéliales lymphatiques humaines hTERT-HDLEC en présence d'une stimulation par des facteurs de croissance et en direction de ceux-ci. Dans un deuxième temps, il s'agit de vérifier si les récepteurs circulants produits par les cellules CHO modifiées sont susceptibles de contrarier voire d'empêcher le déplacement des cellules hTERT-HDLEC en direction du stimulus. Cette inhibition est basée sur l'interaction entre les récepteurs circulants hVEGFR-3 et les facteurs de croissance introduits dans le milieu. Ces derniers sont en effet destinés à masquer le facteur trophique aux récepteurs membranaires portés par les cellules endothéliales.

Les essais sont basés sur la capacité des cellules à évoluer entre des puits séparés par une fine paroi d'agarose.

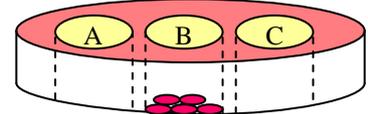
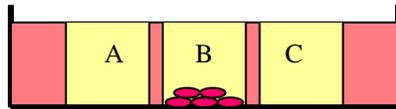
Les systèmes sont conçus dans des boîtes de culture type Petri de 60 mm (Figure M2). Trois cylindres de verre, stérilisés par autoclavage, sont disposés verticalement dans chaque boîte. Les cylindres sont distants de 1 mm les uns des autres. Une solution de PBS 1X est additionnée de 2% de poudre d'agarose puis portée à ébullition, et finalement mélangée avec un volume équivalent de milieu de culture le plus rapidement possible avant refroidissement. La préparation chaude est alors coulée dans les boîtes de Pétri contenant les cylindres de verre. La polymérisation est obtenue environ 20 minutes plus tard. La surface gélifiée est alors imbibée de PBS1X afin de retirer les cylindres de verre sans rompre les fines parois d'agarose séparant les puits.

Le puits central est utilisé pour ensemercer des cellules hTERT-HDLEC (10^5 cellules/puits). Les puits latéraux reçoivent le facteur de chimiotaxie dont on veut estimer l'influence sur le comportement dynamique des cellules endothéliales lymphatiques. Les récepteurs circulants utilisés sont issus de cellules CHO productrices cultivées pendant quatre jours dans des cupules de coculture. Les récepteurs circulants diffusent à travers la paroi des cupules et sont récupérés avec le milieu de culture prêt à être utilisé.

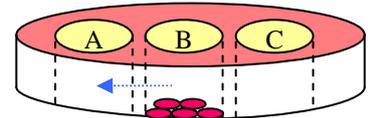
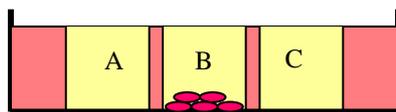
Les résultats sont interprétés après prise de vue numérisée en microscopie inversée et traitement par analyseur d'image Lucia 5.



A: milieu minimum
 B: cellules hTERT-HDLEC
 C: milieu minimum + VEGF-D



A: milieu minimum
 B: cellules hTERT-HDLEC
 C: milieu minimum + VEGF-D + récepteurs circulants



A: milieu minimum + VEGF-D
 B: cellules hTERT-HDLEC
 C: milieu minimum + VEGF-D + récepteurs circulants

Figure M2 : Principe de l'inhibition du chimiotactisme.

Le milieu minimum correspond au milieu de culture des cellules hTERT-HDLEC supplémenté par 3% de SVF. Cet exemple indique la démarche de la mise en évidence de la neutralisation du VEGF-D par les récepteurs circulants. Une stimulation de la migration des cellules lymphatiques par le VEGF-D est dans un premier temps réalisée (en haut, puits C), avant d'évaluer l'inhibition du VEGF-D par les récepteurs circulants (au centre, puits C). Un contrôle supplémentaire est destiné à confirmer ces résultats en confrontant le caractère activateur du VEGF-D sur la migration des cellules hTERT-HDLEC (en bas, puits A) au caractère inhibiteur des récepteurs circulants (en bas, puits C). La flèche bleue indique le déplacement théoriquement attendu dans chaque cas.

II - 1 - 1 - 6 - Test d'inhibition de la formation des tubules lymphatiques

L'objectif de cette étude est double. Il consiste premièrement à vérifier qu'il est possible d'induire expérimentalement la formation des tubules lymphatiques. Ces structures sont les premières ébauches de l'organisation des cellules des endothéliums vasculaires en micro-vaisseaux. Dans un deuxième temps, il s'agit de vérifier que les récepteurs circulants hVEGFR-3 conçus dans cette étude sont capables de perturber la formation de ces structures pré-vasculaires.

L'induction de la formation des tubules lymphatiques est réalisée en cultivant les cellules de l'endothélium vasculaire lymphatique hTERT-HDLEC sur une matrice de collagène en présence de cytokines. La matrice est réalisée à partir de collagène type I (BD Biosciences, Bedford, USA) extrait de tissus de rat. Un mélange (vol/vol) de collagène (2 mg/mL) avec du milieu de culture est préparé, puis additionné à une solution de gélatine à 0,5%, dans la proportion 10/1. L'addition d'une très faible quantité de gélatine est destinée à améliorer la compacité de la matrice. La solution obtenue est utilisée pour coater le fond de boîtes de culture type 6 puits. Les cellules sontensemencées trois heures plus tard à raison de 50000 cellules/mL.

Les surnageants filtrés de cellules CHO productrices des récepteurs circulants sont utilisés pour réaliser les tests d'inhibition de la formation des tubules.

I - 1 - 2 - Clonage de la séquence d'intérêt

II - 1 - 2 - 1 - Extraction des ARN totaux

Cette opération est réalisée à partir de cellules de leucémie humaine (HEL), exprimant fortement VEGFR-3, dans le but de synthétiser de l'ADNc par réaction de rétrotranscription. L'utilisation de cette technique requiert l'exploitation du kit « RNeasy Mini Kit® » (Qiagen, Courtaboeuf, France) dont le principe est basé sur la fixation sélective de l'ARN sur la membrane (gel de silice) de colonnes de centrifugation. Les cellules ($3 \cdot 10^6$ à $1 \cdot 10^7$ par échantillon) sont lysées dans un tampon dénaturant à base d'isothiocyanate de guanidine (tampon RLT : 600 μ L / échantillon) additionné de β -Mercaptoéthanol (1 μ L / 100 μ L de tampon de lyse), et l'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs. Le mélange est

récupéré dans un tube eppendorf et centrifugé (13000 rpm ; 3 min) avant addition d'éthanol à 70% (vol/vol).

La suspension est déposée sur colonne et centrifugée (10000 rpm ; 15 s) avant d'être lavée (tampon RW1 : 350 µL), débarrassée des traces d'ADN génomique (DNase I : 10 µL ; tampon RDD : 70 µL ; 15 min ; température ambiante) puis lavée une seconde fois (tampon RW1 : 350 µL). Les ARN sont finalement traités deux fois par un tampon de lavage sur la colonne (tampon RPE : 500 µL) avant élimination de toute trace d'éthanol par centrifugation (10000 rpm ; 2 min, puis 13000 rpm ; 1 min).

L'éluion est réalisée en déposant sur la colonne de l'eau traitée au DEPC permettant d'éviter toute dégradation par les RNases éventuellement contenues dans l'eau (50 µL par échantillon), suivi d'une centrifugation (10000 rpm ; 1 min). L'intégrité des ARN est vérifiée par électrophorèse et les molécules sont dosées par méthode spectrophotométrique (cf chapitres II- 1- 4 et II- 1- 5).

II - 1 - 2 - 2 - Transcription inverse (RT)

Elle a pour but de transcrire l'ARN messager (ARNm) en ADN complémentaire (ADNc), en utilisant une enzyme : la transcriptase inverse. Cette enzyme utilise les désoxyribonucléotides triphosphates pour former une chaîne d'ADN complémentaire à la chaîne d'ARNm servant de matrice.

Comme toutes les ADN polymérasés, la transcriptase inverse n'est capable d'ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' d'une amorce déjà appariée à la matrice ; comme amorce, on ajoute au préalable des oligo-dT qui s'hybrident à la queue poly-A en 3' des matrices d'ARNm. Cette technique est appliquée en utilisant les réactifs « Omniscript TM Reverse Transcriptase » (Qiagen). La rétrotranscription est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux et se déroule en trois étapes :

- Hybridation des amorces oligo-dT sur la séquence polyadénylée de l'ARN matrice.

- Formation et élongation des molécules d'ADN complémentaires à la séquence d'ARN.

- Destruction de la matrice d'ARN.

La transcription inverse peut être effectuée en une seule étape en réalisant le mélange réactionnel suivant :

- tampon RT 10X	: 2 μ L
- dNTP mix (5 mM chacun)	: 2 μ L
- amorces oligo-dT (10 μ M)	: 1 μ L
- RNase inhibiteur (10 unités/ μ L)	: 1 μ L
- transcriptase inverse Omniscript (0,2 unités/ μ L)	: 1 μ L
- eau DEPC stérile	: qsp 20 μ L
- ARN matrice (1 μ g/ μ L)	: 2 μ L

Le mélange est alors soumis à des variations thermiques destinées à obtenir la formation des molécules d'ADNc à partir des molécules d'ARN, au moyen d'un thermocycleur de type GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems), et selon la programmation suivante :

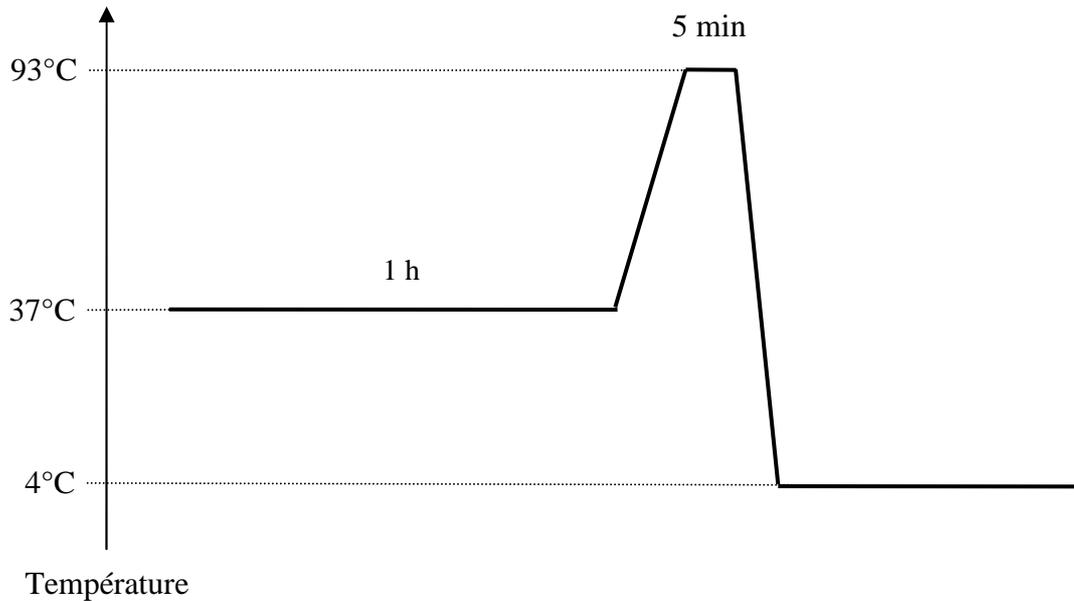


Figure M3 : Programmation des cycles thermiques pour la transcription inverse.

Des contrôles ARN -, contenant tous les réactifs sauf la matrice ARN et RT -, contenant tous les réactifs sauf la transcriptase inverse, ont été inclus de manière à vérifier la qualité des transcriptions.

II - 1 - 2 - 3 - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'amplifier spécifiquement et en quantité très importante une séquence d'ADN d'intérêt. Elle permet en outre l'amplification de l'ADNc obtenu à l'issue de la réaction de transcription inverse décrite préalablement. Elle est basée sur la répétition 30 à 40 fois d'un cycle constitué de trois étapes :

- Dénaturation, c'est-à-dire séparation des doubles brins d'ADNc issus de l'appariement des brins sens et antisens obtenus après la réaction de transcription inverse.
- Hybridation des amorces spécifiquement sélectionnées sur la séquence d'intérêt.

- Synthèse et élongation des brins complémentaires grâce à l'activité d'une enzyme de polymérisation de l'ADN.

Les amorces utilisées pour amplifier la séquence VEGFR-3 d'intérêt sont :

- amorce sens : 5' CTGGTGAGTGGCTACTCCATGACC 3'
- amorce antisens : 5' TCAATGTGGACTGTGGCGCCCGGAC 3'

Elles permettent l'obtention d'un fragment de 1089 pb.

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée en une étape, après préparation du mélange réactionnel suivant :

- tampon PCR 10X	: 4 µL
- dNTP (10 mM)	: 1 µL
- MgCl ₂ (25 mM)	: 3 µL
- amorce sens (15 pmol/µL)	: 1 µL
- amorce antisens (15 pmol/µL)	: 1 µL
- enzyme Ampli Taq Gold™ DNA polymerase (5U/µL)	: 0,25 µL
- eau stérile	: qsp 40 µL
- ADNc matrice (0,7 µg/µL)	: 4 µL

La réaction d'amplification est réalisée à l'aide d'un thermocycleur de type GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems), et selon la programmation suivante :

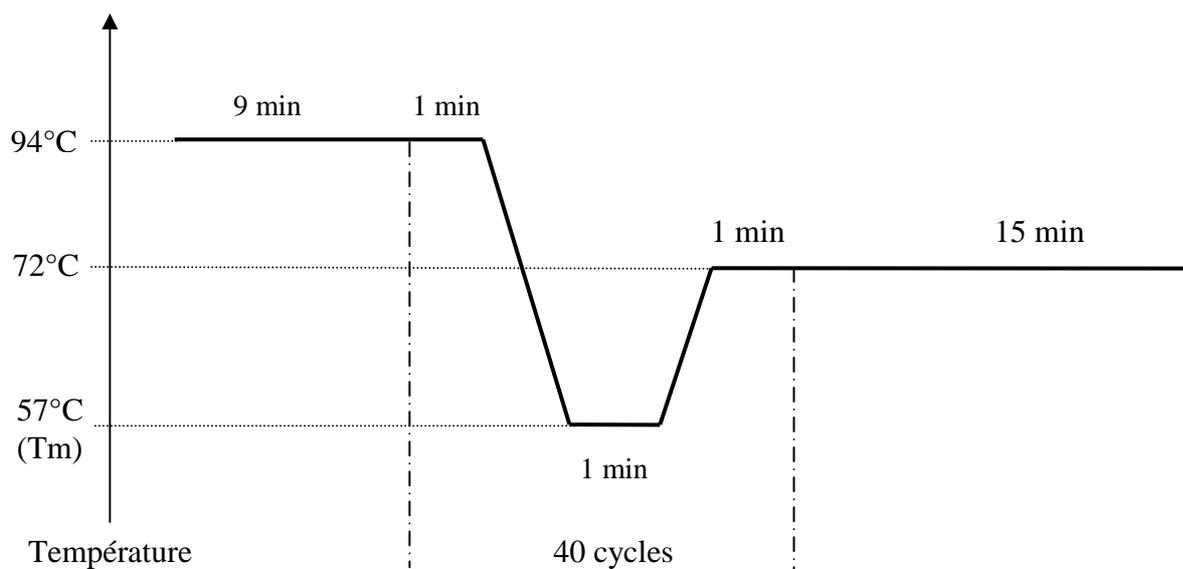


Figure M4 : Programmation des cycles thermiques pour la réaction de polymérisation en chaîne.

L'initiation de la dénaturation est étendue à 9 minutes de manière à améliorer la séparation des doubles brins d'ADN.

II - 1 - 2 - 4 - Construction du vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3

Le vecteur recombinant est obtenu par clonage de la séquence codante d'intérêt VEGFR-3 humaine dans le plasmide pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] (Invitrogen).

Les caractéristiques du plasmide pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] sont présentées dans la figure M5. Il est à noter que la construction est singularisée par deux structures particulières :

- une séquence de sécrétion, la séquence signal de l'IgK murine, destinée à permettre l'exportation de la protéine d'intérêt dans le milieu de culture (Coloma *et al.*, 1992).

- le promoteur du cytomégalo virus P_{CMV} permettant d'assurer un fort niveau d'expression de la séquence d'intérêt clonée en amont du promoteur.

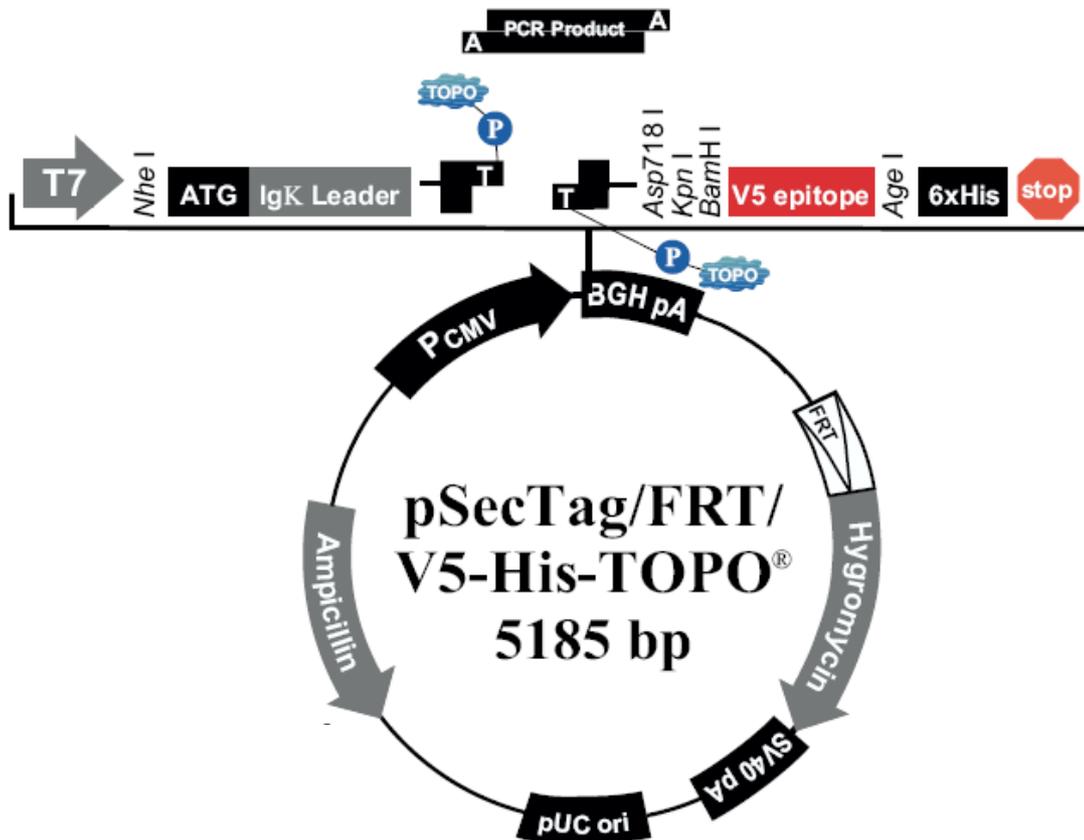


Figure M5 : Carte du plasmide pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] (Invitrogen).

Les produits obtenus à l'issue de la réaction de polymérisation en chaîne sont utilisés directement sans être purifiés pour être intégrés dans le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®], fournit linéarisé. La réaction de clonage est effectuée aussi rapidement que possible

après l'extension des fragments de PCR. L'intégration des inserts hVEGFR-3 dans les vecteurs est obtenue en réalisant le mélange réactionnel suivant :

- produit PCR hVEGFR-3	: 2 μ L
- solution tampon (NaCl 1,2 M ; MgCl ₂ 0,06 M)	: 1 μ L
- eau stérile	: qsp 6 μ L
- vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO [®] linéarisé	: 1 μ L

L'ensemble est agité doucement et incubé pendant 10 minutes à température ambiante (22-23°C). La ligation entre les inserts hVEGFR-3 et les vecteurs pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] est alors réalisée avec un rendement estimé entre 30 et 50%.

Il est à noter que le rendement de la réaction de clonage peut être amélioré en augmentant jusqu'à une durée de 20 minutes le temps d'incubation. En cas de difficulté à obtenir un nombre suffisant de clones, la quantité de produit PCR du mélange réactionnel peut être augmentée jusqu'à 4 μ L, en prenant garde de maintenir le volume total de la réaction à 6 μ L.

Le produit de la réaction de clonage est placé dans la glace en attendant de pratiquer la transformation bactérienne.

II - 1 - 3 - Amplification du vecteur recombinant

II - 1 - 3 - 1 - Transformation bactérienne

Le vecteur recombinant est introduit dans les bactéries en utilisant la technique du choc thermique. Une partie du produit de la réaction de clonage (2 μ L) est mélangée à une suspension de bactéries compétentes *Escherichia coli* (50 μ L) TOP 10 (Invitrogen). Après une incubation de 30 minutes dans la glace, le choc thermique est réalisé en plaçant le mélange

réactionnel à 42°C pendant une durée de 30 secondes, avant d'être de nouveau placé dans la glace.

La brusque élévation de température favorise l'ouverture des pores membranaires des bactéries au moment où l'agitation thermique permet la pénétration des vecteurs recombinants. Le refroidissement soudain du milieu provoque ensuite la contraction de ces mêmes ouvertures et par là-même la séquestration des systèmes vectoriels dans les bactéries. Les bactéries transformées sont placées dans 250 µL de milieu de culture de type SOC (Bacto-Tryptone 20 g/L ; extrait bactérie-levure 5 g/L ; NaCl 8,5 mM ; KCl 2,5 mM ; MgCl₂ 10 mM ; glucose 20 mM ; pH 7), puis placées sous agitation rapide (200 rpm) pendant une heure à 37°C de manière à initier le processus de prolifération des bactéries transformées.

Des prélèvements de 100 à 200 µL de ces suspensions bactériennes sont ensemencés sur des boîtes de gélose LB-agar (LB : Bacto-Tryptone 10 g/L ; extrait bactérie-levure 5g/L ; NaCl 170 mM ; pH 7) contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) (Q-Biogen) destiné à sélectionner les bactéries recombinantes possédant dans la séquence de leur nouveau patrimoine génétique le gène de résistance à cet antibiotique.

La culture des colonies bactériennes sélectionnées s'effectue dans un incubateur à 37°C pendant 12 heures.

II - 1 - 3 - 2 - Amplification et extraction du vecteur recombinant

II - 1 - 3 - 2 - 1 - Minipréparations

Le but de cette étape est de vérifier l'intégrité du produit de la ligation. A la suite de l'ensemencement de la suspension bactérienne sur des boîtes de Petri et après une incubation de 12 heures à 37°C, des clones bactériens se sont développés à la surface des boîtes. Des colonies isolées sont prélevées sur l'agarose puis ensemencées dans 5mL de milieu LB contenant une solution d'ampicilline (100 µg/mL). Chacun des clones ainsi isolé est alors placé à l'incubation à 37°C pendant 12 heures sous agitation, c'est-à-dire jusqu'à la phase exponentielle de croissance des bactéries. Chaque échantillon est utilisé pour constituer un

souchier, obtenu en mélangeant stérilement 700 µL de suspension bactérienne et 300 µL de glycérol. Les souchiers sont consignés à -80°C.

Le reste de chaque suspension bactérienne est centrifugé (700 g ; 10 min ; 4°C), puis soumis au protocole du kit « high pure plasmid isolation kit » (Roche), afin d'obtenir l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique.

La vérification de l'orientation sens ou antisens des vecteurs purifiés est réalisée par utilisation d'enzymes de restriction spécifiquement choisies. Une digestion du plasmide est effectuée par l'enzyme *Pvu* II ayant un site de coupure unique dans l'insert et deux sites de coupure dans le plasmide, pour générer des fragments de tailles caractéristiques de l'orientation de l'insert. La taille des fragments obtenus est de 827, 1804 et 3643 pb si l'insert est intégré dans l'orientation « sens » ou de 1022, 1804 et 3448 pb si l'insert est intégré dans l'orientation « antisens ».

La migration des produits issus des digestions enzymatiques est effectuée sur gel d'agarose à 0,8%.

II - 1 - 3 - 2 - 2 - Maxipréparations

Cette étape est destinée à obtenir la production d'une quantité importante de vecteurs recombinants à partir de la construction d'origine. Elle consiste à mettre en culture une quantité déterminée (150 µL) du plasmide d'intérêt à partir du souchier dans 500 mL de milieu LB en présence d'ampicilline (100 µg/mL). La suspension est incubée pendant 12 heures à 37°C sous agitation afin d'obtenir la multiplication des clones bactériens et par conséquent des vecteurs recombinants.

La suspension bactérienne obtenue est alors traitée selon le protocole du kit « Qiafilter endofree » (Qiagen). Il permet l'élimination des endotoxines présentes dans les échantillons.

Les endotoxines sont des constituants des membranes bactériennes susceptibles de réduire l'efficacité de la transfection, ou encore d'entraîner une activation du système du complément chez l'animal.

L'intégrité des vecteurs recombinants amplifiés et purifiés est vérifiée dans un premier temps par digestions enzymatiques (cf chapitre II- 1- 3- 2- 1) puis par séquençage (Genome Express, Grenoble, France).

II - 1 - 4 - Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie

La quantité d'acide nucléique exprimée en ng/μL dans la suspension biologique obtenue après purification est déterminée selon la formule :

$$C = \frac{A(260) \times \epsilon \times V_t}{V_e} \quad (\text{ng}/\mu\text{L})$$

A(260) : absorbance mesurée à 260 nm

V_t : volume total en μL

V_e : volume de l'échantillon d'acides nucléiques quantifié en μL

ε : coefficient d'extinction molaire en μg/mL

Le coefficient d'extinction molaire est spécifique de chaque type d'acide nucléique. Sa valeur est égale à 33 pour les ADN monocaténares, elle est de 50 pour les ADN bicaténares et de 40 dans le cas des ARN.

La pureté de la suspension d'acides nucléique est estimée par le calcul du rapport A(260)/A(280). Ce rapport doit être supérieur à 1,8 pour les ADN et à 2 dans le cas des ARN. Par ailleurs, la valeur de l'absorbance à 280 nm permet d'avoir une estimation de la quantité de protéines présentes dans l'échantillon.

II - 1 - 5 - Electrophorèse en gel d'agarose

Les acides nucléiques sont dilués dans un tampon échantillon 6X (bleu de bromophénol 2,5 mg/mL ; glycérol 60% ; eau distillée), puis séparés au moyen d'une électrophorèse en gel d'agarose dans un tampon TAE (TAE 50X : Tris-HCl 0,5 M ; acide acétique 50 mM ; EDTA 50 mM ; pH 7,4) ou TBE (TBE 5X : Tris-borate 89 mM ; acide borique 89 mM ; EDTA 2 mM ; pH 7,4) en présence de bromure d'éthidium (bET) à 0,5 µg/mL.

Le bET est un agent intercalant qui s'insinue entre les bases des acides nucléiques et permet leur visualisation lors de leur irradiation par des rayonnements ultraviolets.

La concentration des gels d'agarose utilisés peut varier de 0,8% dans le cas de la détection de fragments dont la taille est comprise entre 500 et 2000 nucléotides jusqu'à 2% dans le cas des fragments de taille inférieure.

II - 1 - 6 - Transfection des cellules

II - 1 - 6 - 1 - Technique de transfection par la lipofectamine

La technique de transfection des cellules en utilisant la lipofectamine permet d'obtenir la pénétration des séquences d'acide nucléique d'intérêt dans les cellules cibles avec une grande efficacité. Elle présente l'avantage de permettre la transfection des cellules simplement, directement dans leur milieu de culture.

La veille de la transfection, les cellules CHO sont lavées dans une solution de PBS 1X, traitées par la trypsine-EDTA pour être récupérées puisensemencées sans antibiotique dans une plaque 6 puits. La densité d'ensemencement est calculée de telle sorte que les cellules se trouvent être entre 90 et 95% de la confluence maximale au moment de la transfection (10^5 cellules/mL). Les meilleurs résultats de non toxicité, d'efficacité de pénétration et d'expression du transgène ont été obtenus dans ces conditions. La présence d'antibiotique au moment de la transfection est susceptible d'entraîner la mort de nombreuses cellules.

Une quantité de 4 µg d'ADN à transférer est mélangée délicatement dans 250 µL de milieu de culture sans sérum. De la même manière, 10 µL de lipofectamine sont mélangés doucement à 250 µL de milieu sans sérum. Les deux suspensions sont incubées à température ambiante pendant 5 minutes, à la suite de quoi les deux mélanges sont réunis, homogénéisés délicatement puis laissés pendant 20 minutes à température ambiante. Les complexes lipofectamine-ADN se constituent alors, ce qui peut entraîner l'opacification de la suspension.

Un volume de 100µL est prélevé à partir de cet échantillon et déposé goutte à goutte dans chaque puits de culture cellulaire, avant d'être réparti de manière homogène.

Les cellules traitées sont placées à l'incubation à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ pendant 24 heures. Les cellules transfectées sont alors décollées de leur support etensemencées au 1/10^{ème} dans des nouveaux puits. La sélection est initiée 24 heures plus tard.

II - 1 - 6 - 2 - Préparation des cellules CHO

Les cellules CHO sont caractérisées par leur capacité de forte expression protéique. Elles sont donc destinées à permettre d'obtenir la production de quantités importantes, du moins suffisantes, de protéines recombinantes. Cependant, ces cellules ne sont pas capables d'accepter directement une intégration de la séquence d'intérêt. Il est nécessaire de les modifier une première fois par l'introduction d'un plasmide nommé pFRT/*lacZeo2* (Invitrogen) (Figure M6).

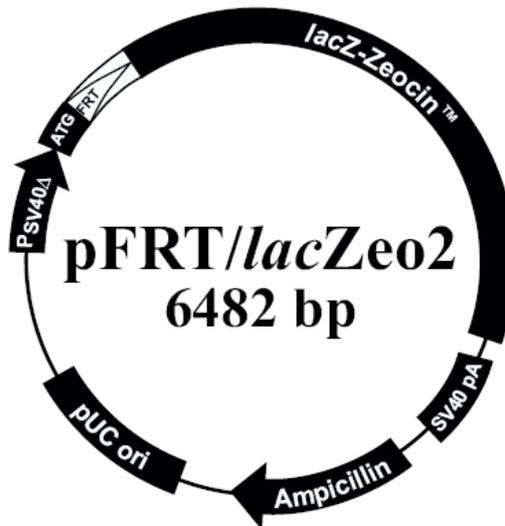


Figure M6 : Carte du plasmide pFRT/lacZeo2 (Invitrogen).

Ce plasmide, présenté dans le figure 21, permet de rendre les cellules CHO compétentes pour intégrer ultérieurement la séquence hVEGFR-3 associée au plasmide pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] selon les caractéristiques du système Flp-In (Invitrogen). Ce procédé permet d'une part d'insérer une séquence génique avec précision et d'autre part de générer des lignées cellulaires d'expression extrêmement stables.

Pour cela, un site FRT (Flp Recombination Target) a été introduit dans la séquence du plasmide en amont immédiat du codon d'initiation de manière à favoriser la fixation et le clivage du vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 en vue de la recombinaison génétique (Figure M9).

Ces modifications des caractéristiques génomiques des cellules CHO s'accompagnent de l'acquisition du gène de résistance à la zéocine permettant de détecter et de sélectionner les cellules recombinées nommées CHO/pFRT.

II - 1 - 6 - 3 - Cytotoxicité de la zéocine sur les cellules CHO

La zéocine est un antibiotique de la famille bléomycine/phléomycine utilisé en tant qu'agent de sélection des cellules de mammifères (Musant *et al.*, 1988). Sa toxicité est très importante du fait notamment de la présence d'un ion cuivreux au sein de la molécule (Figure M7).

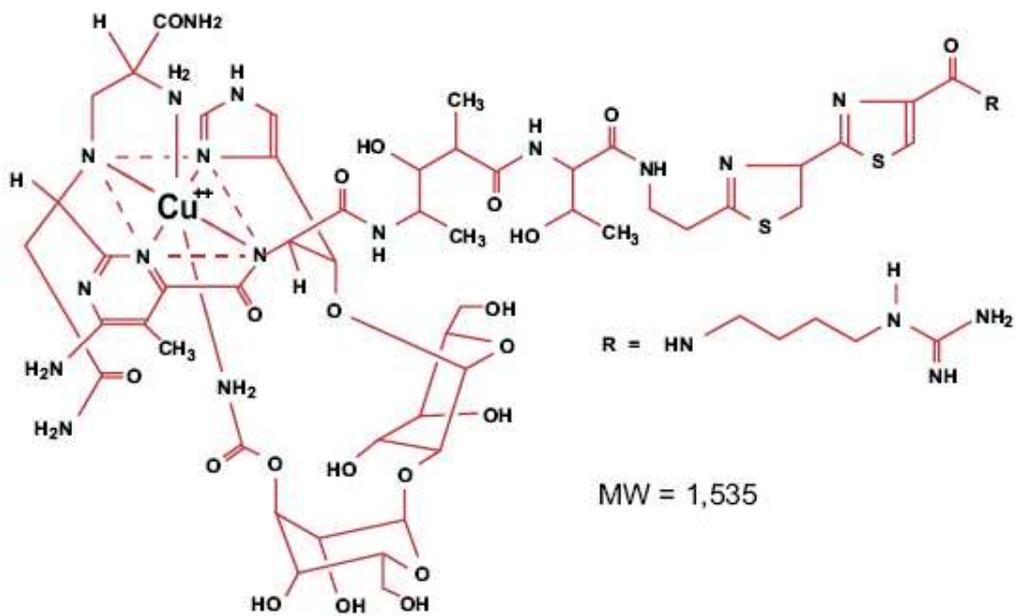


Figure M7 : Structure moléculaire de la zéocine (Invitrogen).

Le gène *Sh ble* (*Streptoalloteichus hindustanus* bléomycine) qui induit la résistance à la zéocine code une protéine de 13,7 kDa qui se fixe sur la zéocine et inhibe son activité de clivage de l'ADN (Drocourt *et al.*, 1990 ; Calmels *et al.*, 1991).

II - 1 - 6 - 4 - Co-transfection avec le plasmide pOG44

Les cellules CHO/pFRT sont transfectées par le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 en présence du plasmide pOG44 (Figure M8), selon la technique à la lipofectamine (proportions 50/50).

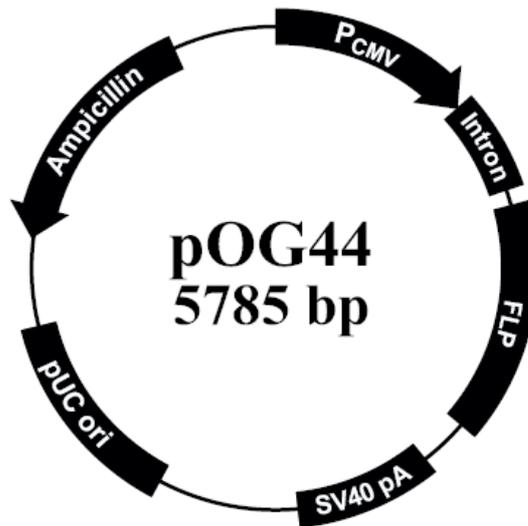


Figure M8 : Carte du plasmide pOG44 (Invitrogen).

Le plasmide pOG44 contient la séquence d'une recombinase dont l'expression assure la recombinaison génétique entre le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 et les sites FRT. Cette recombinaison est conservative et les potentialités d'introduction de mutations ponctuelles au niveau du site de recombinaison sont négligeables (Craig *et al.*, 1984).

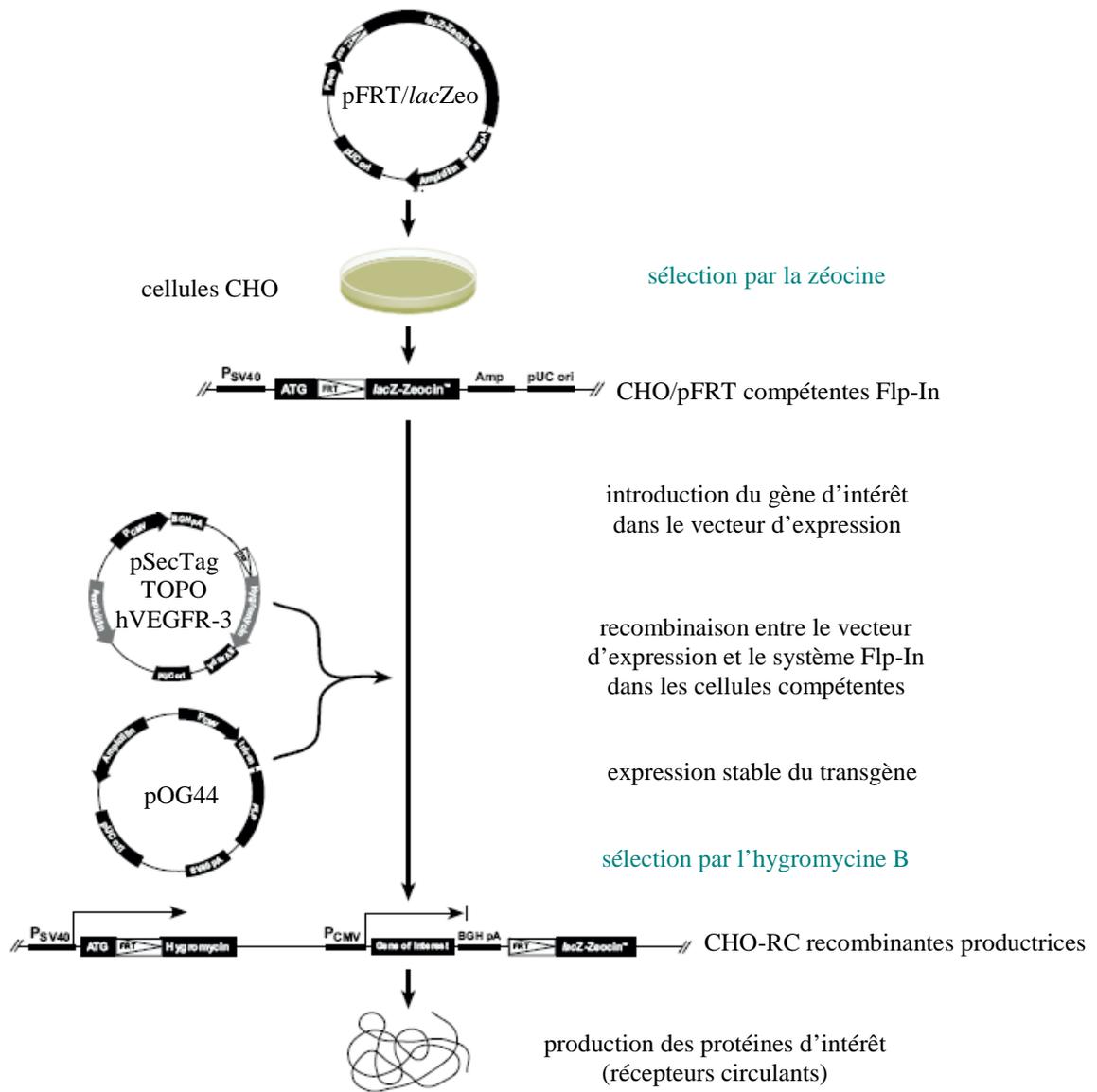


Figure M9 : Production des récepteurs circulants VEGFR-3 par le système Flp-In.

II - 1 - 6 - 5 - Sélection des clones cellulaires

Les cellules CHO transfectées par les plasmides pFRT, puis pOG44 et pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/VEGFR-3 et composées de populations hétérogènes, sont ensemencées à raison de 1000 à 2000 cellules par boîte de culture cellulaire 100 mm en présence de milieu de culture complet et d'un antibiotique de sélection, l'hygromycine B (250 µg/mL). Le milieu est renouvelé tous les deux jours.

Les clones résistants à l'action de l'antibiotique de sélection sont repérés au moyen d'un objectif de marquage à encre adapté au microscope et l'évolution des clones marqués est contrôlée tous les jours par observation microscopique. Environ dix à douze jours suivant l'ensemencement, des clones résistants forment des amas cellulaires de quelques dizaines de cellules. L'isolement est réalisé à l'aide de la technique dite des cylindres creux. Les cellules sont lavées par une solution de PBS 1X et un cylindre creux aseptisé, stabilisé à sa base par de la vaseline stérile, est appliqué autour de chaque clone marqué.

Une solution de trypsine-EDTA (20 µL) est déposée à l'intérieur de chaque cylindre et les boîtes de culture sont placées à l'incubation pendant 10 minutes à 37°C. Au terme de l'incubation, chaque clone est récupéré par aspiration à la pipette et ensemencé individuellement en plaque de culture 24 puits, contenant 2 mL de milieu complet et de l'hygromycine B (250 µg/mL). Lorsque la confluence est atteinte, les clones sont récupérés et mis en culture en boîtes de Pétri 100 mm pour obtenir des quantités suffisantes pour l'analyse et la mise en réserve.

II - 1 - 7 - Analyse de l'expression des récepteurs circulants hVEGFR-3

II - 1 - 7 - 1 - Extraction des protéines

Les cellules CHO transfectées par le système d'expression sont récupérées par trypsination puis centrifugées (1500 rpm ; 10 min ; 4°C). Les culots cellulaires sont remis en suspension dans un tampon de lyse RIPA (HEPES 50mM pH 7,5 ; deoxycholate 1% ; nonidet P40 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150 mM ; aprotinine 20 µg/mL) à raison de 100 µL/10⁷ cellules, additionné de Complete (40 µL/mL). Les lysats sont incubés pendant 10 minutes dans la glace, puis soniqués 3 fois pendant 15 secondes au froid, avant d'être centrifugés

(5000 g ; 10 min ; 4°C). Les concentrations de protéines cellulaires sont déterminées en utilisant la méthode colorimétrique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

II - 1 - 7 - 2 - Western blot

II - 1 - 7 - 2 - 1 - Migration des protéines : électrophorèse sur gel SDS-PAGE

Un volume d'échantillon correspondant à 100 µg de protéines est mélangé à un volume équivalent de 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). La solution protéique est alors dénaturée par chauffage au bain-marie à 100°C pendant 5 minutes.

La migration et la séparation des protéines sont pratiquées au moyen d'une électrophorèse de type SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel) dans un gel à gradient de 4-15%. La migration est faite à 120 mA pendant 1 heure dans du tampon de migration 1 X (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; eau qsp 500 mL).

II - 1 - 7 - 2 - 2 - Transfert sur membrane de nitrocellulose

Il s'agit de réaliser le transfert des protéines à partir du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose (Amersham, Orsay, France), par application d'une tension électrique faible sur les deux supports en contact, en présence d'un tampon électrolytique approprié (Tris 50 mM ; glycine 383,5 mM ; méthanol 20% ; SDS 0,1% ; pH 8,1-8,5). La membrane de nitrocellulose constitue, en effet, une base adéquate en vue de la révélation des protéines au moyen d'anticorps spécifiques.

La membrane de nitrocellulose, préalablement préparée par une immersion de 20 minutes dans du tampon de transfert, est mise au contact du gel d'électrophorèse entre deux feuilles de papier Whatman imbibées avec le même tampon, le tout étant disposé dans une cuve de transfert. La tension appliquée est de 20 volts à température ambiante pendant une durée d'une heure.

II - 1 - 7 - 2 - 3 - Incubation avec les anticorps

Lorsque les protéines ont été transférées sur leur nouveau support, la membrane de nitrocellulose est lavée deux fois dans un bain de tampon TBS 1X (NaCl 150 mM ; Tris-base 50 mM ; eau ; pH 7,5) pendant 10 minutes à température ambiante et sous agitation.

La membrane est alors incubée pendant une heure sous agitation dans un tampon de blocage (TBS 1X ; Tween-20 0,05% ; lait écrémé 4%) destiné à saturer les sites de liaison non spécifiques des protéines, et ainsi obtenir une meilleure spécificité de reconnaissance entre l'anticorps primaire et la protéine d'intérêt.

La membrane est lavée avant d'être incubée pendant 8 heures à 4°C avec l'anticorps primaire anti-VEGFR-3 humain (AF 349 anti-human VEGFR-3 specific goat Ig-G) (R&D systems). Cet anticorps produit chez la chèvre est spécifique de la région extracellulaire de la protéine. L'anticorps est utilisé à la dilution 1/500^{ème} dans du tampon de blocage.

Une seconde série de lavages est réalisée dans du tampon TBS 1X/Tween-20 (0,1%) avant une incubation de 1h30 sous agitation à température ambiante avec l'anticorps secondaire (P 0449 polyclonal rabbit anti-goat Ig-G HRP) (DakoCytomation). Il s'agit d'un anticorps polyclonal de lapin anti Ig-G couplé à la peroxydase HRP (« horseradish peroxidase »). Il est utilisé à la dilution 1/2000^{ème} dans du tampon de blocage.

La membrane est lavée une dernière fois dans 6 bains successifs de tampon TBS 1X/Tween-20 (0,1%) avant d'être révélée.

II - 1 - 7 - 2 - 4 - Réaction de chimioluminescence

La membrane est incubée pendant 1 minute sous agitation lente dans un mélange volume/volume des réactifs du kit de détection de la chimioluminescence ECLTM (Amersham). Après avoir été séchée sur du papier absorbant pendant quelques minutes, la membrane est exposée au contact d'un film radiographique (Amersham) selon des durées variables allant de 1 minute à 30 minutes, de telle sorte d'obtenir l'intensité de signal la plus convenable.

La révélation des films radiographiques impressionnés est effectuée en utilisant un développeur automatique (Kodak Diagnostic Imaging, processeur RP X-OMAT modèle M6B).

II - 1 - 8 - RT-PCR quantitative

II - 1 - 8 - 1 - Lignées cellulaires

Dix sept lignées cellulaires, tumorales ou non, ont été incluses dans l'étude de l'expression des ARNm :

- lignées de mélanome (M1Dor, M4Beu, M3Dau et T1P26).
- cellules sanguines normales (lymphocytes T) ou tumorales (Jurkat, HEL, et Molt4).
- adénocarcinome de colon, primaire (HT29-C119A, WiDr, SW480) ou de nodule lymphatique (SW620, issue du même patient que les SW480, un an plus tard).
- lignées cancéreuses d'origines diverses (neuroblastome : SHSY5Y ; carcinome pulmonaire : A549 ; ostéosarcome : MNNG/HOS, adénocarcinome mammaire : MDA-MB-231 ; carcinome de vessie : T24).

Les cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 (A549, SHSY5Y, T24, Molt4, Jurkat, HEL), DMEM (MDA-MB-231, HT29-C119A), Leibovitz-15 (SW480, SW620), McCoy 5A modifié (M1Dor, M4Beu, M3Dau, T1P26) et MEM (MNNG/HOS, WiDr). Tous les milieux utilisés (Gibco-Invitrogen) contiennent 10% de SVF (v/v) et 2 mM glutamine (Gibco-Invitrogen). Pour la culture des cellules WiDr, 1% d'acides aminés non essentiels (v/v) est ajouté au milieu.

II - 1 - 8 - 2 - Transcription inverse

L'utilisation de la technique de transcription inverse au cours des expérimentations de RT-PCR quantitative est basé sur les mêmes principes et applications que pour les expériences de RT-PCR non-quantitative décrits précédemment. Deux types de contrôles ont été utilisés :

- un contrôle RT-, pour chaque ARN extrait, contenant tous les réactifs sauf la transcriptase inverse.

- un contrôle ARN- contenant tous les réactifs mais pas de matrice ARN.

II - 1 - 8 - 3 - PCR quantitative en temps réel de VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 et G6PDH

Le principe de la PCR quantitative en temps réel utilisée ici repose sur l'incorporation d'un fluorochrome, le SybrGreen (SG), dans le petit sillon de l'ADN double brin. Après l'étape d'élongation de chaque cycle de PCR, le Light Cycler (Version 3.5, Roche) effectue une mesure de la fluorescence émise par le SybrGreen incorporé dans l'ADN double brin. L'augmentation de la fluorescence est donc directement corrélée avec la quantité d'ADN synthétisé et elle est visualisée en temps réel sur un moniteur. Le point d'intersection entre la tangente au point d'inflexion maximum (seconde dérivée maximum) de la courbe de fluorescence et la ligne de base est appelé « crossing point » ou Cp. Le Cp est automatiquement calculé par le logiciel pour chaque échantillon. Pour chaque gène, des gammes étalons d'amplification sont réalisées. Elles indiquent le nombre de cycles de PCR au moment du début de l'amplification en fonction de la concentration de l'ADNc. Le taux d'ADNc, donc d'ARNm cible, de chaque échantillon est ensuite calculé en fonction du Cp au moment du début de l'amplification, par report sur la gamme étalon (logiciel de quantification relative, Roche).

La spécificité de chaque amplification est contrôlée par une courbe de fusion à la fin de chaque PCR : l'ADN double brin est dénaturé très lentement jusqu'à ce que sa température de fusion caractéristique soit atteinte. Le SybrGreen est alors relargué dans le milieu réactionnel, ce qui se caractérise par une brusque chute de fluorescence sur le moniteur. La dérivée première de la fluorescence permet d'obtenir un pic unique, garant de la spécificité d'amplification et de l'absence de contamination.

Les amorces sens et antisens sont systématiquement choisies sur 2 exons différents afin d'éviter les faux positifs qui pourraient résulter de l'amplification d'ADN génomique contaminant (Amplify 1.2 et serveur BLASTn de la base de données NCBI ; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La séquence et la localisation des amorces utilisées pour la mesure du taux d'expression des ARNm de VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 ainsi que du gène de ménage G6PDH sont les suivantes :

Gène et numéro d'accèsion	Amorces sens (s) et antisens (as)	Position
VEGF-C (NM_005429)	(s) 5' CACGAGCTACCTCAGCAAGA 3' (as) 5' GCTGCCTGACACTGTGGTA 3'	Exon 3 Exons 4-5
VEGF-D (NM_004469)	(s) 5' CCTGAAGAAGATCGCTGTTC 3' (as) 5' GAGAGCTGGTTCCTGGAGAT 3'	Exons 4-5 Exon 6
VEGFR-3 (NM_02020)	(s) 5' CCTGAAGAAGATCGCTGTTC 3' (as) 5' GAGAGCTGGTTCCTGGAGAT 3'	Exons 10-11 Exon 12
G6PDH (NM_000402)	(s) 5' TGGAGAATGAGAGGTGGGATG 3' (as) 5' GAGCTTCACGTTCTTGTATCTGT 3'	Exon 8 Exons 9-10

L'amplification PCR des ADNc issus de la transcription inverse est effectuée en utilisant le kit du fournisseur au moyen d'un thermocycleur LightCycler (Version 3.5, Roche). Chacun des produits de la transcription inverse est utilisé pour 4 amplifications différentes, avec les amorces spécifiques des gènes VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3 ou G6PDH. Les taux d'ARNm de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 sont exprimés sous forme de ratios normalisés (VEGF-C ou VEGF-D ou VEGFR-3 ARNm/G6PDH ARNm) en unité relative arbitraire (U.R.A).

Les réactifs suivants sont mélangés dans des capillaires (volume final 20 µL) :

- 2 µL de produit de transcription inverse pur ou dilué en série (1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000)
- MgCl₂ 3 mM (G6PDH) ou 4 mM (VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3)
- 2 µL de mix fourni dans le kit "Fast Start SYBR Green I" (Roche)

- amorces sens et antisens 0,3 μ M (G6PDH) ou 0,5 μ M (VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3).

Les programmes de PCR sont les suivants:

<i>Paramètre</i>	<i>Valeurs</i>		
Dénaturation initiale			
Nombre de cycles	1		
Temperature (°C)	95(VEGF-C, VEGF-D) ou 96 (VEGFR-3) ou 98 (G6PDH)		
Temps d'incubation (s)	480		
Amplification			
Nombre de cycles	50		
Température (°C)	Segment 1 95 (VEGF-C, VEGF-D) ou 96 (VEGFR-3) ou 98 (G6PDH)	Segment 2 60 (VEGFR-3, G6PDH) ou 62 (VEGF-C, VEGF-D)	Segment 3 72
Temps d'incubation (s)	10	4 (VEGF-D) ou 5 (VEGF-C, VEGFR-3) ou 6 (G6PDH)	7 (VEGF-D) ou 8 (VEGF-C, VEGFR-3) ou 11 (G6PDH)

Courbe de fusion			
Nombre de cycles	1		
Température (°C)	Segment 1 95(VEGF-C,VEGF-D) ou 96 (VEGFR-3) ou 98 (G6PDH)	Segment 2 65 (VEGFR-3, G6PDH) ou 67 (VEGF-C,VEGF-D)	Segment 3 95(VEGF-C, VEGF-D) ou 96 (VEGFR-3) ou 98 (G6PDH)
Temps d'incubation (s)	10	30	0

II - 1 - 9 - Imagerie médicale

L'utilisation de la technique d'imagerie médicale par lymphoscintigraphie est destinée à réaliser la localisation du ganglion sentinelle, premier relais en cas de dissémination métastatique par voie lymphatique. Le repérage, le prélèvement puis l'analyse histopathologique du ganglion sentinelle ont été étudiés chez le rat sain ou tumoral. Ces expérimentations sont destinées à disposer d'une technique permettant d'estimer la potentialité de dissémination métastatique par la voie lymphatique des tumeurs solides.

II - 1 - 9 - 1 - Principe de la lymphoscintigraphie au technétium radioactif

Le sulfure de rhénium colloïdal et de technétium [⁹⁹Tc] utilisé au cours de ces expérimentations est un colloïde métallique dont la captation est réalisée au niveau du premier groupe ganglionnaire. Cependant, le colloïde est protégé par une couche gélatineuse qui permet une diffusion au-delà de ce premier groupe.

Il s'agit d'un marqueur spécifiquement approprié à la mise en évidence des vaisseaux et des ganglions lymphatiques. Les mesures d'activité au niveau des ganglions lymphatiques

montre que $3,06 \% \pm 0,10 \%$ de l'activité administrée sont fixés à la première heure et $3,83 \% \pm 0,16 \%$ à la troisième heure.

Au cours des 4 premières heures après l'administration, le passage dans le compartiment vasculaire sanguin est négligeable.

Les données expérimentales indiquent que le produit est éliminé par voie urinaire et hépatique.

II - 1 - 9 - 2 - Visualisation du ganglion sentinelle

Chaque rat est anesthésié au moyen d'un mélange oxygène/isoflurane à 3%, puis reçoit l'administration par injection intradermique, au niveau de l'extrémité des membres de $100 \mu\text{L}$ de Nanocis[®] (CIS bio international, Gif sur Yvette, France) correspondant à une dose de 18.5 MBq ($500 \mu\text{Ci}$). L'absorption du colloïde par les capillaires lymphatique débute dès les premières minutes après l'injection et le premier groupe ganglionnaire est parfaitement identifiable un heure plus tard.

L'acquisition des images est effectuée sous camera à scintigraphie, puis l'excision de la pièce marquée est pratiquée. Le repérage de la zone de fixation de la radioactivité est guidé par utilisation d'une sonde type Europrobe (Eurorad, Vienne). Une vérification sur le rat de la présence ou de l'absence de la zone de fixation radioactive au niveau du ganglion sentinelle est réalisée sous caméra, et la pièce est conservée dans une solution de PBS 1X pendant 24 heures avant d'être analysée par examen anatomo-pathologique.

II - 2 - Résultats

L'objectif de notre travail a essentiellement consisté à concevoir des récepteurs circulants reproduisant la structure de liaison entre le récepteur VEGFR-3 humain et les facteurs de croissances activant la lymphangiogenèse pendant le développement tumoral, puis à évaluer leur efficacité *in vitro*.

La première étape a consisté à déterminer la séquence protéique susceptible de permettre la fixation entre le récepteur circulant et son ligand (VEGF-C ou VEGF-D), et à cloner la séquence codante correspondante, à partir du gène VEGFR-3 humain, dans un vecteur d'expression plasmidique.

La synthèse et la sécrétion des protéines recombinantes ont ensuite été réalisées en introduisant par transfection le système d'expression vectoriel dans des cellules mammifères productrices.

La dernière partie de l'étude a consisté à évaluer la capacité des récepteurs circulants à interagir avec les facteurs de croissance activateurs du processus lymphangiogénique, ainsi qu'à inhiber la croissance de cellules humaines de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, puis à vérifier que ces protéines recombinantes étaient susceptibles de contrarier le déplacement orienté de ces cellules et d'empêcher la formation des microvaisseaux lymphatiques.

II - 2 - 1 - Elaboration de la séquence d'intérêt hVEGFR-3

II - 2 - 1 - 1 - Détermination de la séquence codante d'intérêt

Le récepteur humain au VEGFR-3 se lie aux dimères de VEGF-C ou -D (Figure R1 A). Cette fixation se réalise au niveau des trois derniers des sept domaines extracellulaires de la protéine (Figure R1 B). La conception des récepteurs circulants destinés à bloquer le VEGF-C ou -D avant sa fixation sur le récepteur membranaire est basée sur la reconstitution

d'une protéine formée par les trois domaines d'interaction avec ces facteurs de croissance (Figure R1 C).

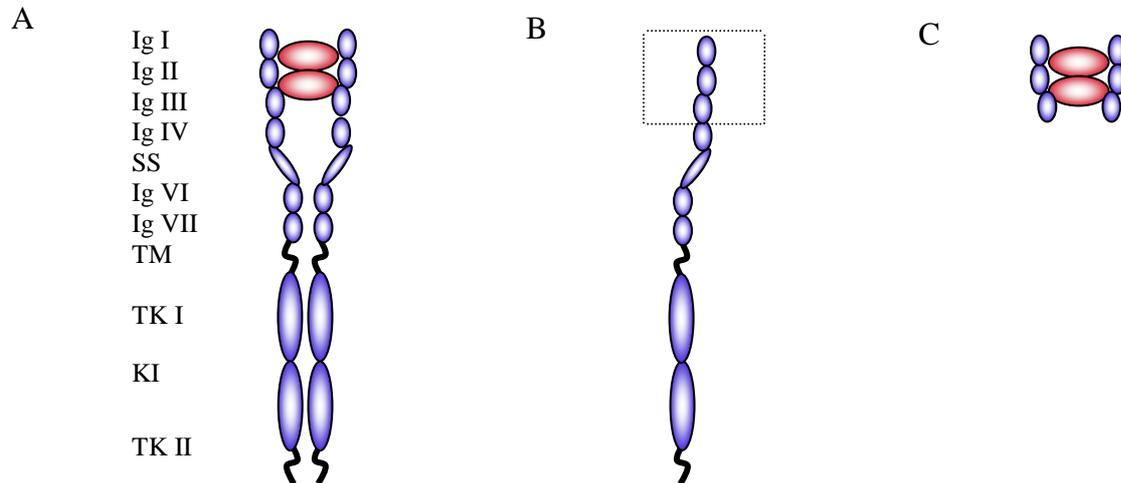


Figure R1 : Structure du récepteur humain au VEGFR-3 et du site de liaison aux facteurs de croissance VEGF-C ou -D.

Le récepteur VEGFR-3 (en bleu) est composé de deux domaines tyrosine kinase (TK) séparés par une courte séquence d'insertion (KI) et de sept domaines extracellulaires dont les trois derniers sont spécifiquement responsables de la liaison avec les facteurs de croissance VEGF-C ou VEGF-D (en rouge).

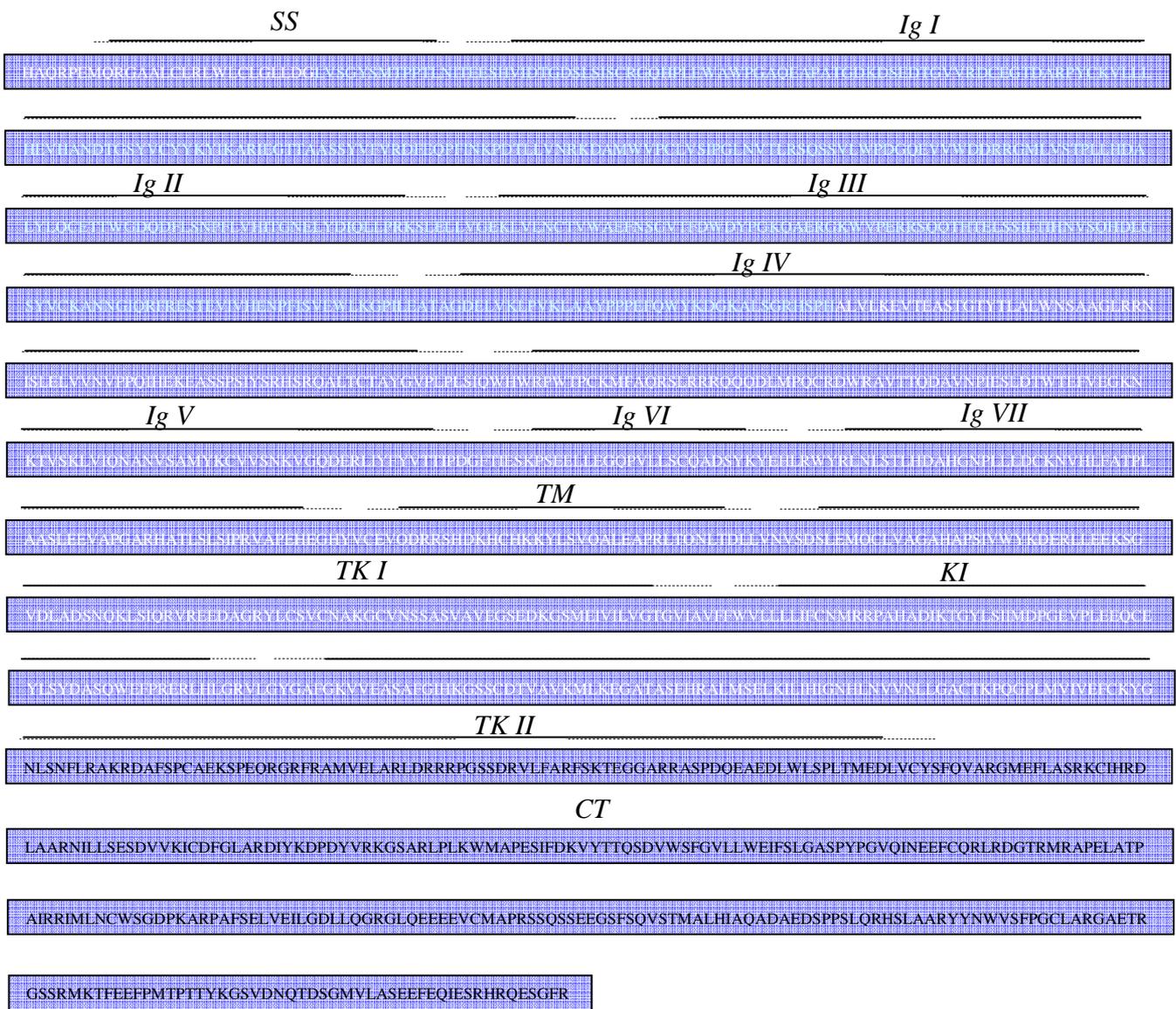


Figure R2 : Séquence des acides aminés correspondant aux différents domaines de la protéine humaine VEGFR-3.

Le récepteur VEGFR-3 est formé par une succession de 1472 acides aminés. Les domaines extracellulaires Ig I, Ig II et Ig III sont suffisants pour permettre la liaison avec les facteurs de croissance. Les acides aminés notés en clair représentent la séquence protéique des récepteurs circulants.

La séquence codante du récepteur humain VEGFR-3 est constituée par 4416 nucléotides. Ceux-ci correspondent à un assemblage déterminé et connu de 1472 acides aminés dont la séquence est référencée ci-dessus (Figure R2). Les séquences des différents domaines de la protéine ont quant à eux été déduits et rapportés à partir des connaissances actuelles (Aprelikova *et al.*, 1992).

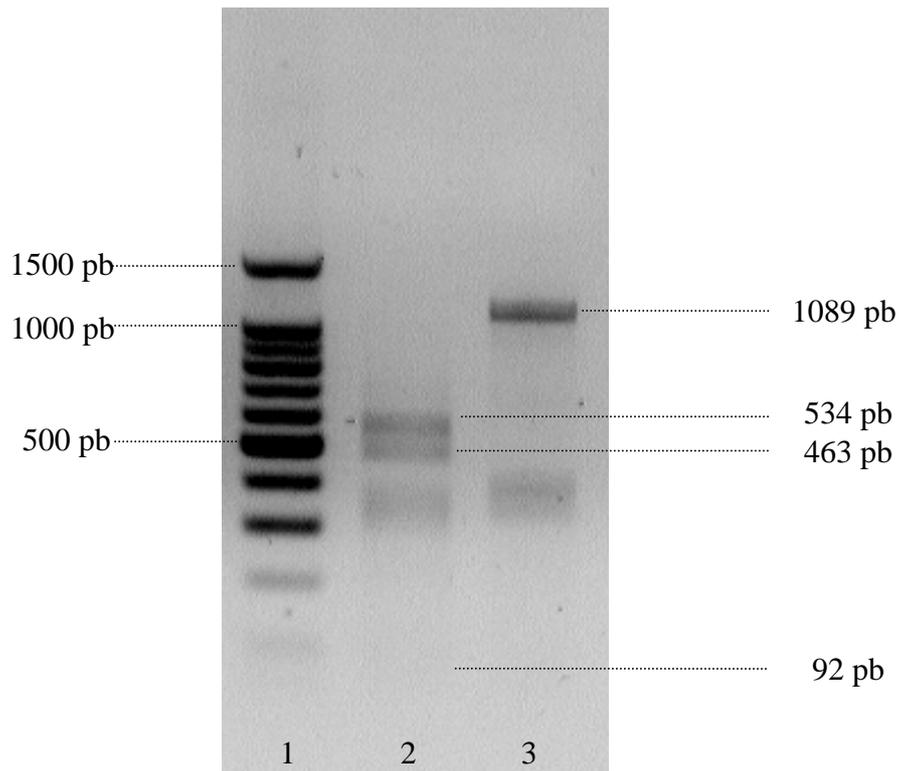
La partie signalée en clair correspond à la séquence en acides aminés choisie et destinée à être reproduite pour concevoir les récepteurs circulants. Elle correspond à la reconstitution des trois domaines extracellulaires terminaux Ig I, Ig II et Ig III, flanquée d'une partie de chacun des domaines voisins.

Les récepteurs circulants sont formés par 363 acides aminés (en clair sur la Figure R2) codés par une suite connue de 1089 paires de bases.

II - 2 - 1 - 2 - Synthèse par réaction RT-PCR

Différents types de cellules d'origine humaines ont été testées afin d'y déceler une expression suffisante du récepteur VEGFR-3. Les cellules de leucémie humaine HEL ont été retenues pour être la source de récupération du matériel génétique destiné à servir de support matriciel afin de synthétiser la séquence nucléotidique des récepteurs circulants.

Après extraction des ARN totaux, vérification de l'intégrité des molécules et transcription inverse, l'ADNc issu des cellules HEL est utilisé comme matrice pour obtenir après PCR les fragments de 1089 paires de bases codant la fraction protéique d'intérêt :



puits 1 : marqueur de poids moléculaire 100 pb

puits 2 : produit PCR hVEGFR-3 scindé par l'enzyme de restriction *Pst*I

puits 3 : produit PCR hVEGFR-3

Figure R3 : Electrophorèse des fragments hVEGFR-3 obtenus après RT-PCR à partir des ARNm de cellules HEL.

La digestion du fragment d'intérêt par l'enzyme de restriction Pst I (puits 2) confirme la nature de la séquence amplifiée (puits 1) en libérant trois fragments de 92, 463 et 534 paires de bases.

Les produits issus de la PCR réalisée à partir de l'ARN des cellules humaines HEL ont une taille estimée à 1089 pb conforme à celle escomptée (Figure R3 puits 3). Une vérification est cependant effectuée en utilisant l'enzyme de restriction *Pst*1.

Considérant la carte de restriction de la séquence codante du VEGFR-3 humain, il est connu que la digestion enzymatique par *Pst*1 est théoriquement à l'origine de la partition du fragment initial en trois fragments de 534, 463 et 92 pb respectivement.

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% confirme ces estimations.

II - 2 - 2 - Clonage

II - 2 - 2 - 1 - Introduction de la séquence hVEGFR-3 d'intérêt dans le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO®TA

Les produits hVEGFR-3 de 1089 pb générés par réaction de polymérisation en chaîne sont immédiatement intégrés par réaction de clonage dans le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO®TA pour obtenir la construction ci-dessus (Figure R4).

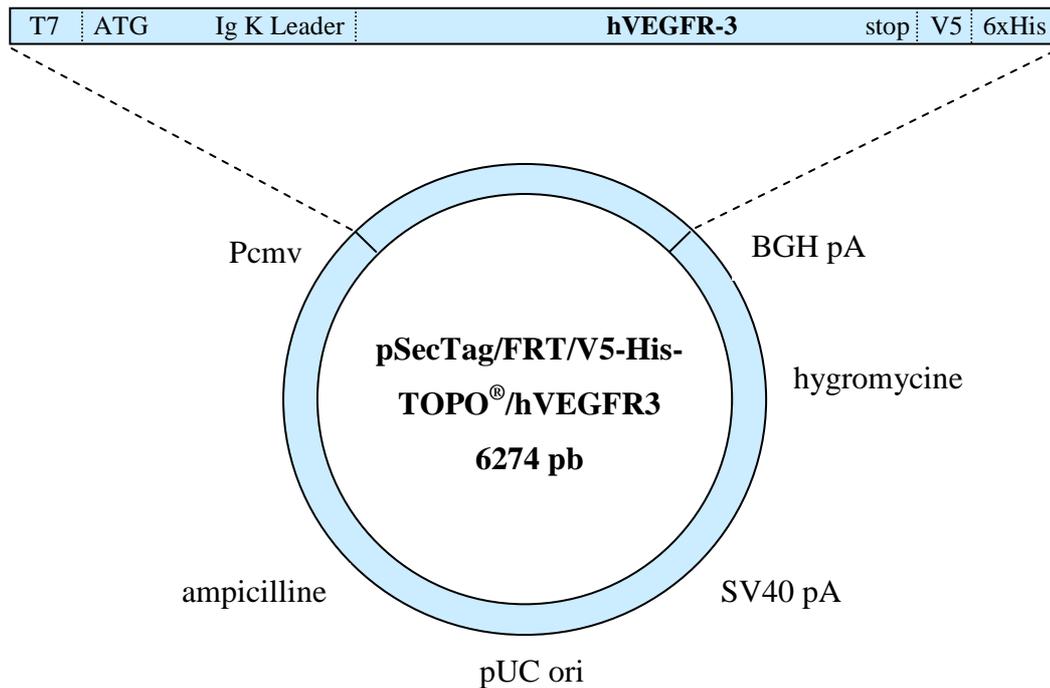
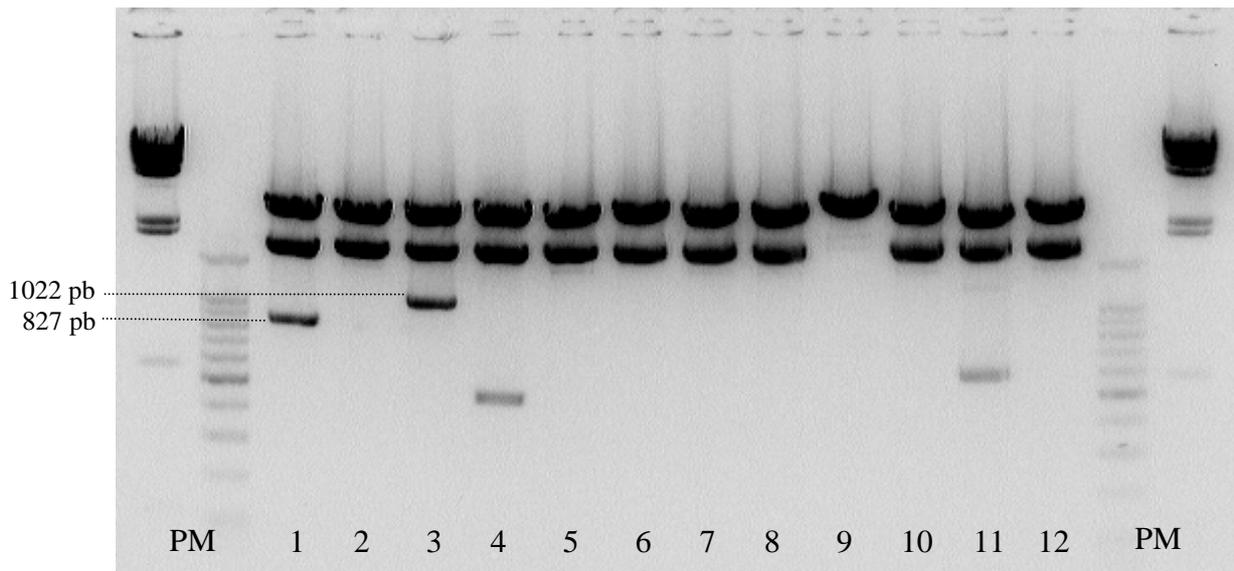


Figure R4 : Vecteur d'expression pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA après intégration de la séquence codante hVEGFR-3 d'intérêt.

L'insert correspondant à la séquence codante des récepteurs circulants est placé sous la dépendance d'un promoteur fort (Pcmv), immédiatement en amont d'une séquence de sécrétion de la protéine recombinante (IgK Leader).

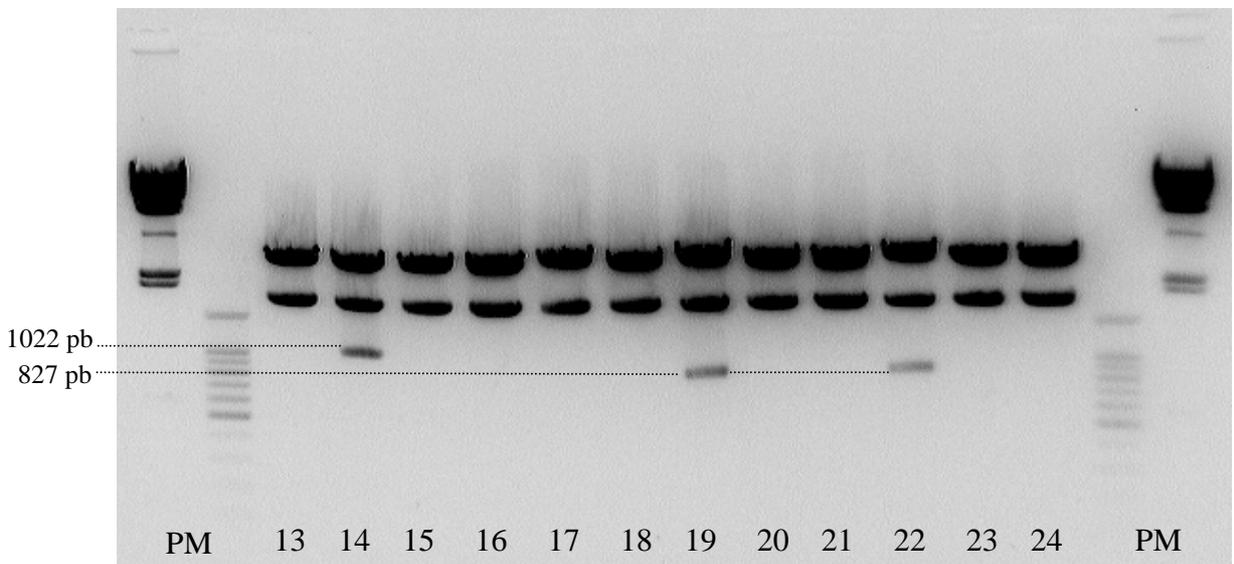
II - 2 - 2 - 2 - Vérification par digestions enzymatiques

A l'issue du clonage de la séquence hVEGFR-3 dans le vecteur pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA, l'ADN plasmidique est extrait des colonies bactériennes ayant servi à l'amplification, puis analysé par digestion enzymatique. Les résultats sont rapportés dans la Figure R5. Ils montrent l'existence de clones bactériens non recombinants (exemple : puits 2), de clones recombinants avec la séquence d'intérêt dans l'orientation antisens (exemple : puits 3) et de clones recombinants avec la séquence dans l'orientation sens (exemple : puits 1).



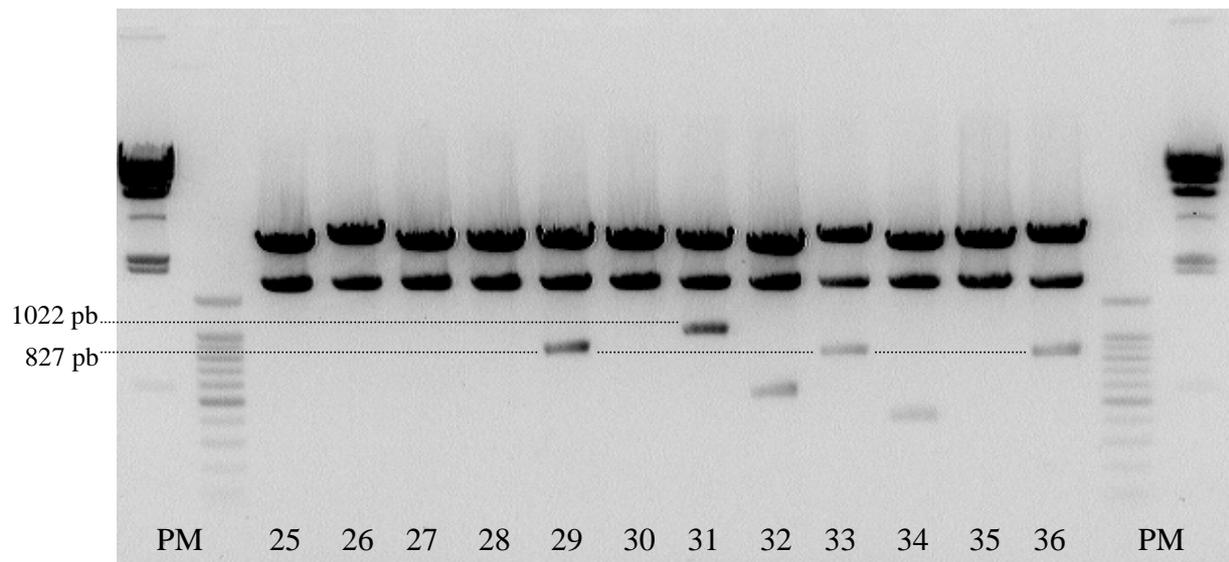
Clone 1 : sens

Clone 3 : antisens



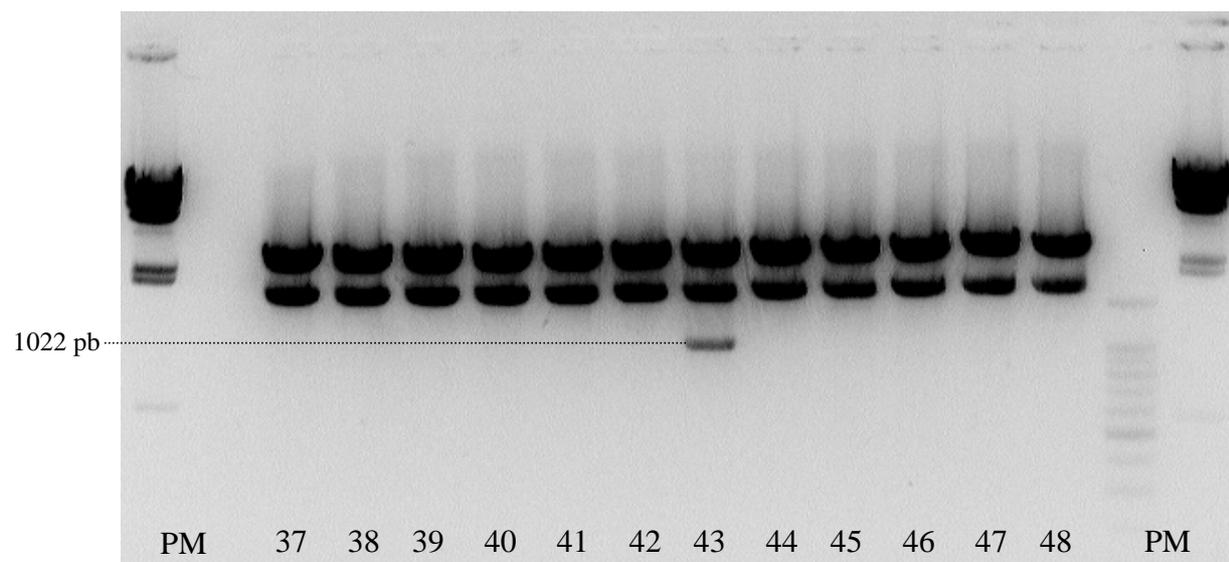
Clone 14 : antisens

Clones 19 et 22 : sens



Clones 29, 33 et 36 : sens

Clone 31 : antisens



Clone 43 : antisens

Figure R5 : Vérification du clonage de hVEGFR-3 par digestion enzymatique *Pvu II*.

II - 2 - 2 - 3 - Vérification par séquençage

Les digestions par l'enzyme de restriction *Pvu* II permettent de préjuger de l'intégration et de l'orientation des inserts hVEGFR-3 dans le vecteur d'expression pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA. Elles ne permettent en aucun cas d'affirmer de manière rigoureuse que la séquence recombinée correspond précisément à la séquence théorique.

Cette incertitude est levée grâce à l'utilisation de la technique de séquençage qui permet d'identifier la succession des nucléotides dans la zone restructurée.

Après le séquençage d'un premier clone aux alignements imparfaits (clone 1), l'identité du vecteur recombinant correspondant au clone 19 (Figure R5) et dont l'insert semble être correctement orienté est soumis à un séquençage dans les orientations sens (amorces T7) et antisens (amorces Bgh). Le résultat du séquençage est présenté dans les figures R6 et R7.

Il permet de constater en outre que la séquence ne comporte aucune erreur par rapport à la séquence décrite par Aprelikova (Aprelikova *et al.*, 1992). Le cadre de lecture de la construction est intact et la fusion entre la séquence signal de l'IgK murine et l'épitope V5, flanquant de part et d'autre l'insert hVEGFR-3, a été concrétisée sans anomalie.

séquence clone 19 →
 séquence banque →

```

10      20      30      40      50      60
ACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGTTCCACTGGTGACGGGCCAG
X:.....
ACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGTTCCACTGGTGACGGGCCAG
920      930      940      950      960      970

70      80      90      100     110     120
CCGGCCAGGCGCGCGCGCGTACGAAGCTCGCCCTTCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACC
.....
CCGGCCAGGCGCGCGCGCGTACGAAGCTCGCCCTTCTGGTGAGTGGCTACTCCATGACC
980      990     1000     1010     1020     1030

130     140     150     160     170     180
CCCCCGACCTTGAACATCACGGAGGAGTCACACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCC
.....
CCCCCGACCTTGAACATCACGGAGGAGTCACACGTCATCGACACCGGTGACAGCCTGTCC
1040    1050    1060    1070    1080    1090

190     200     210     220     230     240
ATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCCTCGAGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCCCA
.....
ATCTCCTGCAGGGGACAGCACCCCTCGAGTGGGCTTGGCCAGGAGCTCAGGAGGCCCA
1100    1110    1120    1130    1140    1150

250     260     270     280     290     300
GCCACCGGAGACAAGGACAGCGAGGACACGGGGTGGTGCGAGACTGCGAGGGCACAGAC
.....
GCCACCGGAGACAAGGACAGCGAGGACACGGGGTGGTGCGAGACTGCGAGGGCACAGAC
1160    1170    1180    1190    1200    1210

310     320     330     340     350     360
GCCAGGCCCTACTGCAAGGTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCAGC
.....
GCCAGGCCCTACTGCAAGGTGTTGCTGCTGCACGAGGTACATGCCAACGACACAGGCAGC
1220    1230    1240    1250    1260    1270

370     380     390     400     410     420
TACGTCTGCTACTACAAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCACGGCCGCGAGTCC
.....
TACGTCTGCTACTACAAGTACATCAAGGCACGCATCGAGGGCACCACGGCCGCGAGTCC
1280    1290    1300    1310    1320    1330

430     440     450     460     470     480
TACGTGTTGCTGAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTC
.....
TACGTGTTGCTGAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCCTGACACGCTCTTGGTC

490     500     510     520     530     540
AACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCAG
.....
AACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCCCGGCCTCAATGTCAG
1400    1410    1420    1430    1440    1450

550     560     570     580     590     600
CTGCGCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGACAGGAGTGGTGTGGGATGACCCG
.....
CTGCGCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGACAGGAGTGGTGTGGGATGACCCG
1460    1470    1480    1490    1500    1510

610     620     630     640     650     660
CGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCGAGACC
.....
CGGGGCATGCTCGTGTCCACGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTACCTGCAGTGCGAGACC
1520    1530    1540    1550    1560    1570

*
670     680     690     700     710     720
ACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGCACATCACAGGCAACGAG
.....
ACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTTCCAACCCCTTCCTGGTGCACATCACAGGCAACGAG
1580    1590    1600    1610    1620    1630

730     740     750     760     770     780
CTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGGGGAGAAGCTG
.....
CTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCTGGTAGGGGAGAAGCTG
1640    1650    1660    1670    1680    1690

790     800     810     820
GTCCTGAACCTGCACCGTGTGGGCTGAGTTAACTCAGGTGTCA
.....
GTCCTGAACCTGCACCGTGTGGGCTGAGTTAACTCAGGTGTCA
1700    1710    1720    1730

```

Figure R6 : Séquençage du clone 19 hVEGFR-3 (amorces sens T7).

séquence clone 19 →
 séquence banque →

```

    10      20      30      40      50      60
CACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTTCGTGAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCC
X:.....
CACGGCCGCCAGCTCCTACGTGTTTCGTGAGAGACTTTGAGCAGCCATTCATCAACAAGCC
    1330    1340    1350    1360    1370    1380

    70      80      90      100     110     120
TGACACGCTCTTGGTCAACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCC
.....
TGACACGCTCTTGGTCAACAGGAAGGACGCCATGTGGGTGCCCTGTCTGGTGTCCATCCC
    1390    1400    1410    1420    1430    1440

    130     140     150     160     170     180
CGGCCTCAATGTCACGCTGCGCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGT
.....
CGGCCTCAATGTCACGCTGCGCTCGCAAAGCTCGGTGCTGTGGCCAGACGGGCAGGAGGT
    1450    1460    1470    1480    1490    1500

    190     200     210     220     230     240
GGTGTGGGATGACCGCGGGGCATGCTCGTGTCCAGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTA
.....
GGTGTGGGATGACCGCGGGGCATGCTCGTGTCCAGCCACTGCTGCACGATGCCCTGTA
    1510    1520    1530    1540    1550    1560

    250     260     270     280     290     300
CCTGCAGTGCAGACCACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTCCAAACCCCTTCCTGGTGCA
.....
CCTGCAGTGCAGACCACCTGGGGAGACCAGGACTTCCTTCCAAACCCCTTCCTGGTGCA
    1570    1580    1590    1600    1610    1620

    310     320     330     340     350     360
CATCACAGGCAACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCT
.....
CATCACAGGCAACGAGCTCTATGACATCCAGCTGTTGCCAGGAAGTCGCTGGAGCTGCT
    1630    1640    1650    1660    1670    1680

    370     380     390     400     410     420
GGTAGGGGAGAAGCTGGTCTGAACTGCACCCGTGTGGGCTGAGTTAACTCAGGTGTCAC
.....
GGTAGGGGAGAAGCTGGTCTGAACTGCACCCGTGTGGGCTGAGTTAACTCAGGTGTCAC
    1690    1700    1710    1720    1730    1740

    430     440     450     460     470     480
CTTTGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGCGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGAGC
.....
CTTTGACTGGGACTACCCAGGGAAGCAGGCAGCGGGTAAGTGGGTGCCCGAGCGAGC
    1750    1760    1770    1780    1790    1800

    490     500     510     520     530     540
CTCCAGCAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGCCAGCA
.....
CTCCAGCAGACCCACACAGAACTCTCCAGCATCCTGACCATCCACAACGTCAGCCAGCA
    1810    1820    1830    1840    1850    1860

    550     560     570     580     590     600
CGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACAACGGCATCCAGCGATTCGGGAGAGCAC
.....
CGACCTGGGCTCGTATGTGTGCAAGGCCAACAACGGCATCCAGCGATTCGGGAGAGCAC
    1870    1880    1890    1900    1910    1920

    610     620     630     640     650     660
CGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCAAAGGACCCATCCT
.....
CGAGGTCATTGTGCATGAAAATCCCTTCATCAGCGTCGAGTGGCTCAAAGGACCCATCCT
    1930    1940    1950    1960    1970    1980

    670     680     690     700     710     720
GGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCGTGAAGCTGGCAGCGTACCCCCC
.....
GGAGGCCACGGCAGGAGACGAGCTGGTGAAGCTGCCCGTGAAGCTGGCAGCGTACCCCCC
    1990    2000    2010    2020    2030    2040

    730     740     750     760     770     780
GCCCCAGTCCAGTGGTACAAGGATGGAAAGGCACTGTCCGGGCGCCACAGTCCACATTG
.....
GCCCCAGTCCAGTGGTACAAGGATGGAAAGGCACTGTCCGGGCGCCACAGTCCACATTG
    2050    2060    2070    2080    2090    2100

    790     800     810     820
AAAGGGCGAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGAAGGTAAGCCTAT
.....X
AAAGGGCGAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGAAGGTAAGCCTAT
    2110    2120    2130    2140
  
```

Figure R7 : Séquençage du clone 19 hVEGFR-3 (amorces antisens Bgh).

II - 2 - 3 - Transfections

II - 2 - 3 - 1 - Transfection des cellules CHO par le vecteur pFRT

Les cellules CHO sont transfectées par le vecteur pFRT en utilisant la technique à la lipofectamine. La sélection par la zéocine (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) débute 48 heures après la transfection des cellules CHO. La croissance des cellules n'est alors pas affectée et les cellules sont détachées à la trypsine pour être ensemencées à faible densité, soit environ 100 cellules par boîtes de culture cellulaires type Petri 100 mm. Cette étape est destinée à faciliter l'individualisation des clones cellulaires.

II - 2 - 3 - 2 - Isolement des clones CHO/pFRT

Les clones ensemencés à faible densité sont laissés pendant quatre jours sous culture sélective normale, jusqu'à ce que des amas cellulaires de clones contiennent assez de cellules pour subir la technique d'isolement par cylindres creux. Au moment de l'isolement, les amas constituent des colonies de quelques centaines de cellules (Figure R8).

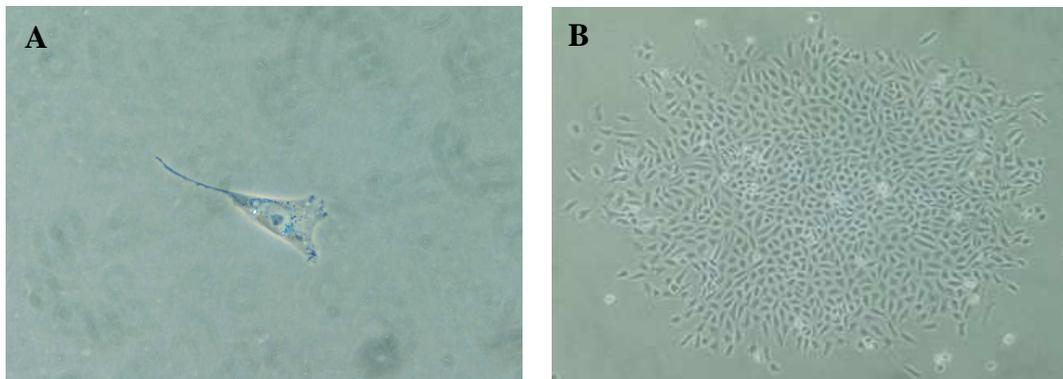


Figure R8 : Isolement et amplification des clones cellulaires CHO/pFRT.

Les cellules individualisées (A : grossissement X 40) se développent en amas au terme de quatre jours de culture en milieu sélectif (B : grossissement X 10).

II - 2 - 3 - 3 - Co-transfection des cellules CHO/pFRT par pOG44 et pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3

Les clones cellulaires CHO/pFRT isolés préalablement puis amplifiés, sont de nouveau modifiés génétiquement par transfection des vecteurs pOG44 et pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3. Cette transformation définitive du génome cellulaire est destinée à permettre la production et la sécrétion par ces cellules des récepteurs circulants VEGFR-3 humains. Au terme de la transfection, la sélection est initiée au bout de 48 heures. On observe alors que la croissance des cellules est affectée, jusqu'à entraîner la disparition de la plus grande partie de celles-ci. Les clones survivants sont interrompus dans leur développement normal. Cette circonstance est déplorée au terme des cinq premiers essais de modification des cellules CHO/pFRT en cellules CHO-RC. Un essai supplémentaire dans les mêmes conditions permet d'obtenir des colonies viables, croissantes et morphologiquement ordinaires. On décrit par CHO-RC les clones théoriquement producteurs de récepteurs circulants, c'est à dire au terme des trois transfections sus-décrites.

II - 2 - 3 - 4 - Isolement des clones CHO-RC

Au terme de 6 jours de culture en conditions sélectives sous hygromycine B, les cellules CHO-RC sont remises en culture à raison d'environ 100 cellules par boîte de Pétri 100 mm, afin d'être individualisées par la technique des cylindres creux (Figure R9).

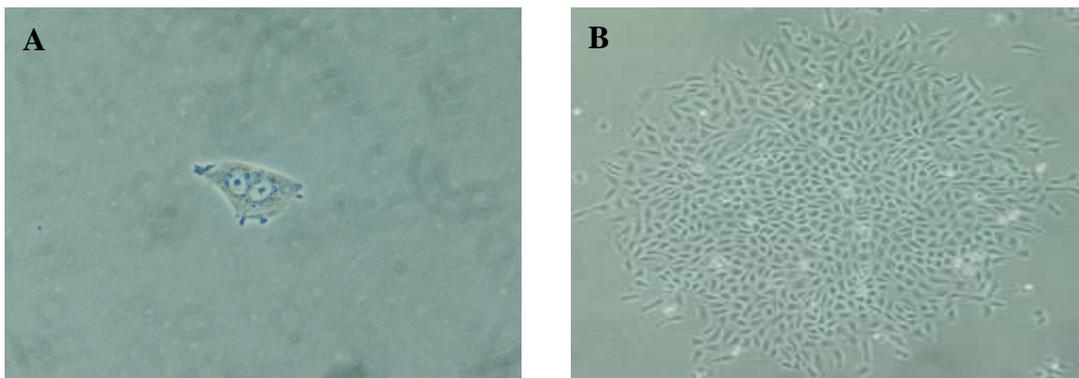


Figure R9 : Isolement et amplification des clones cellulaires producteurs des récepteurs circulants CHO-RC (A : grossissement X 40 ; B : grossissement X 10).

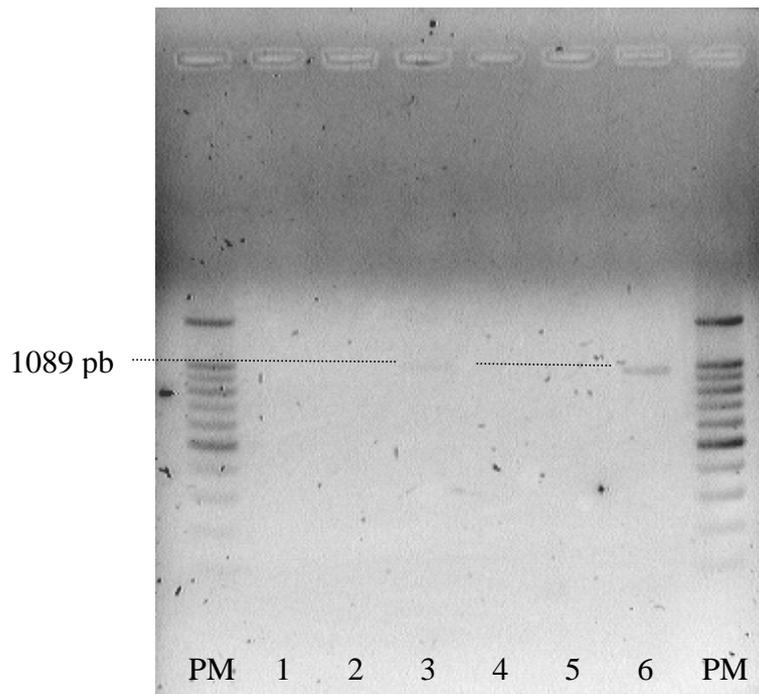
II - 2 - 4 - Mise en évidence de la production des récepteurs circulants

II - 2 - 4 - 1 - Vérification de l'intégration des plasmides recombinants

La sélection des clones cellulaires par des antibiotiques spécifiques autorise théoriquement à considérer que les transfections sont abouties et que les vecteurs d'expression ont effectivement bénéficié d'une recombinaison efficace au sein du génome des cellules hôtes. Cependant certaines formes de résistances aux antibiotiques, bien qu'exceptionnelles, peuvent survenir. Les cellules survivant dans ces conditions seraient alors des « faux-positifs ».

Une première vérification simple consiste à extraire l'ADN génomique des clones sélectionnés après transfection et isolement, puis à réaliser une réaction de polymérisation en chaîne en utilisant cette matrice nucléique. Les amorces utilisées sont celles qui s'hybrident spécifiquement à la séquence introduite, déjà utilisées pour réaliser l'amplification des inserts hVEGFR-3 d'intérêt en vue du clonage.

Les cellules CHO non transfectées, CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA, CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3, CHO/pFRT et CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA ont été utilisées comme témoin. Elles sont sensées ne pas posséder le transgène, à l'exception des cellules CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 qui ne doivent théoriquement l'exprimer que de manière très faible, puisqu'elles ne disposent pas du système FRT permettant une recombinaison génétique efficace.



Puits 1 : CHO non transfectées

Puits 2 : CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA (plasmide vide ; sans système FRT)

Puits 3 : CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 (sans système FRT)

Puits 4 : CHO/pFRT

Puits 5 : CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA (plasmide vide)

Puits 6 : CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 (CHO-RC)

PM : poids moléculaire 100 bp

Figure R10 : Vérification de l'intégration des vecteurs pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 dans le génome des cellules CHO.

Les cellules dans lesquelles la séquence codante des récepteurs circulants hVEGFR-3 a été intégrée présentent une amplification variable du fragment d'intérêt en fonction de la présence ou de l'absence du système de recombinaison génétique FRT (puits 3 et 6).

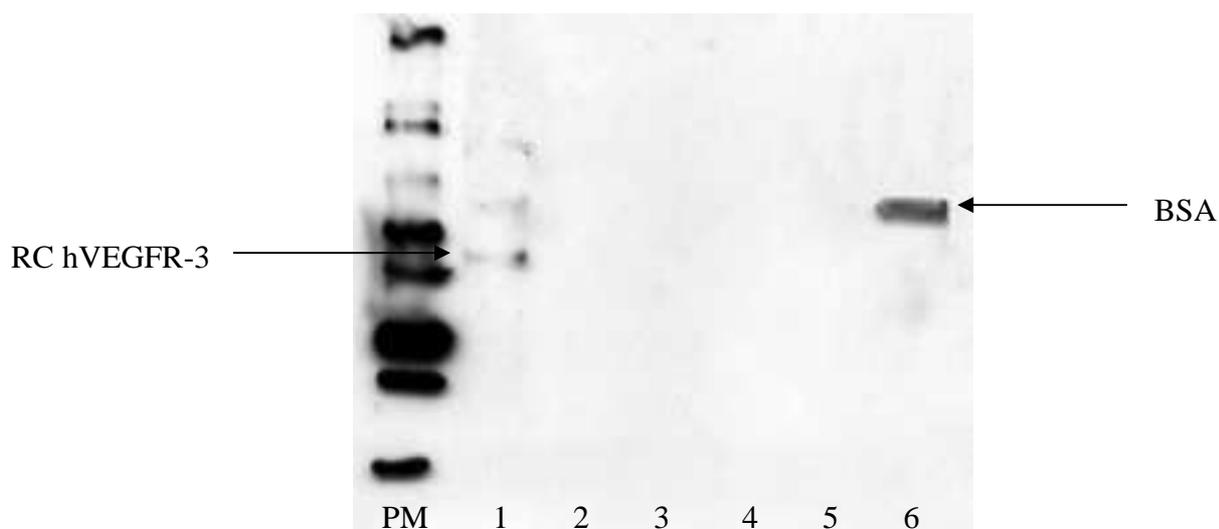
Le résultat des amplifications permet de détecter un fragment de taille attendue pour le cas des cellules CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 (CHO-RC), signifiant la présence de l'insert recherché (Figure R10). Ces cellules sont issues d'un clone. La présence de ce fragment est également retrouvée dans le cas des cellules CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3, mais l'intensité du signal est beaucoup plus faible. Cette différence peut être interprétée par l'efficacité moindre de la recombinaison génétique dans le cas des cellules CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 du fait de l'absence du système FRT.

II - 2 - 4 - 2 - Western Blot

La technique du Western Blot est utilisée afin de mettre en évidence la production des récepteurs circulants hVEGFR-3 (RC hVEGFR-3) par les cellules CHO transfectées par les systèmes d'expression pFRT, pOG44 et pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3, et dénommées CHO-RC.

La mise en évidence est basée sur l'utilisation d'un anticorps de détection spécifique de la partie extracellulaire du récepteur VEGFR-3 humain, et la comparaison avec l'expression protéique de populations cellulaires témoins ne produisant pas les récepteurs circulants hVEGFR-3.

Le résultat de cette détection est présenté dans la figure R11. Elle indique la présence d'un signal de 40 kDa environ dans le puits 1 correspondant aux cellules CHO-RC productrices des récepteurs solubles hVEGFR-3. La taille déterminée pour ce fragment correspond à celle attendue pour les récepteurs circulants. Aucun des puits présentant l'expression protéique dans les cellules témoins (puits 2 à 5) ne laisse apparaître ce signal. Le signal localisé au niveau du puits 6 correspond à l'albumine bovine sérique (BSA) et indique la présence d'une structure de 60 kDa.



Puits 1 : CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 (CHO-RC)

Puits 2 : CHO non transfectées

Puits 3 : CHO/pSecTag/V5-His TOPO[®]TA (plasmide vide; sans système FRT)

Puits 4 : CHO/pFRT

Puits 5 : CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA (plasmide vide)

Puits 6 : BSA

Figure R11 : Détection de l'expression des récepteurs circulants VEGFR-3 d'origine humaine (RC hVEGFR-3) par Western Blot.

La migration est réalisée à partir des protéines totales extraites des cellules sus-citées, séparées sur gel SDS-PAGE en conditions dénaturantes puis transférées sur membrane de nitrocellulose avant détection par les anticorps primaire (AF 349 Anti-human VEGFR-3 specific goat Ig-G) et secondaire (P 0449 polyclonal rabbit anti-goat Ig-G HRP).

II - 2 - 5 - Evaluation de l'efficacité des récepteurs circulants

Il a été démontré précédemment que les systèmes vectoriels d'expression des protéines recombinantes conçus au cours de ce travail permettent effectivement d'obtenir la production des récepteurs circulants déterminés, après transfection des cellules CHO *in vitro*. Ces derniers, qui sont destinés à exercer une activité anti-lymphangiogénique sur des cellules endothéliales humaines, nécessitent désormais d'être testés de telle sorte de déterminer d'une part si les protéines recombinantes ont la capacité de se lier avec les facteurs de croissance concernés, et d'autre part, si cette interaction conduit à une inhibition efficace et significative de la croissance, des dispositions migratoires des cellules lymphatiques et de la formation des micro-tubules vasculaires.

Les populations de cellules utilisées dans ces expérimentations ne se comportent pas de manière identique. En particulier, leurs croissances *in vitro* sont singulièrement différentes, et ne requièrent pas les mêmes conditions de culture. De plus, les cellules transfectées CHO-RC sont cultivées en conditions sélectives en présence d'un antibiotique : l'hygromycine B. Une étude comparative de la croissance des cellules CHO-RC et hTERT-HDLEC a par conséquent été nécessaire pour établir des conditions de coculture verticale satisfaisantes. Il a ainsi été déterminé que la croissance des cellules CHO-RC sans antibiotique et en présence du milieu de culture des cellules hTERT-HDLEC, supplémenté par du SVF (3%) en présence des facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D à la concentration de 200 ng/mL, était permise pour la durée du protocole établi.

Les cellules CHO-RC, hTERT-HDLEC, mais également les cellules CHO non transfectées et CHO/pFRT, utilisées comme cellules témoins dans les expériences de coculture ont été prises en considération dans cette étude.

L'analyse des courbes de croissance comparatives indique que les croissances des cellules CHO non transfectées et transfectées ne sont pas strictement similaires mais cependant comparables. En effet, la confrontation des courbes de croissance des cellules non transfectées CHO d'une part, et des cellules transfectées CHO/pFRT, et CHO-RC d'autre part ne permet pas de discerner de différences notables.

Les cellules CHO transfectées et non transfectées ont une phase stationnaire dont la durée est de 48 heures environ suivie d'une phase exponentielle de croissance. Le temps de doublement moyen est de 20 heures. Les cellules CHO transfectées ont donc une croissance globalement similaire à celle des cellules parentales. La phase de latence n'est pas prolongée, et le temps de doublement ne semble que peu ou pas diminué. L'état de confluence de ces trois populations cellulaires ne présente pas de différence discriminante après quinze jours de culture. L'évolution de ces cellules en milieu hTERT-HDLEC minimum supplémenté par SVF (3%) et VEGF-C ou VEGF-D à la concentration de 200 ng/mL peut par conséquent être considérée comme satisfaisante et applicable pour la réalisation des tests de coculture verticale (Figures R12 et R13).

La croissance des cellules hTERT-HDLEC est quant à elle significativement plus lente (test non paramétrique de Mann-Whitney) dès les premiers jours de la culture. La phase de latence est estimée à 48 heures, et le temps de doublement est alors de 36 heures environ. La confluence n'est atteinte au terme du 6^{ème} jour et les cellules supportent cette densité sans difficulté jusqu'au quinzième jour.

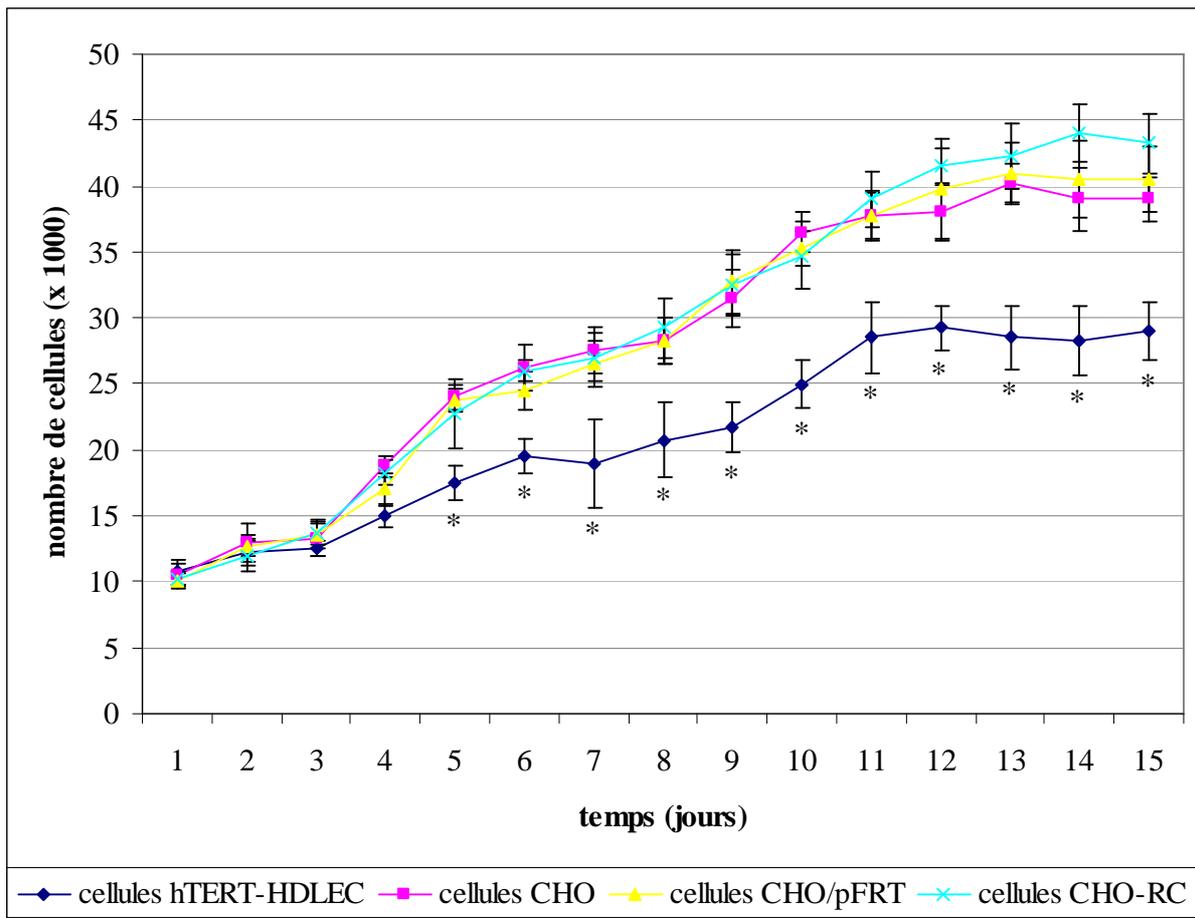


Figure R12 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC, CHO (non transfectées), CHO/pFRT et CHO-RC (productrices des récepteurs circulants) en présence de VEGF-C (200ng/mL).

L'interprétation de ces évolutions parallèles permet de préciser les conditions de la coculture verticale : sa durée maximale (15 jours), le moment du dépôt des cupules (deuxième jour après l'ensemencement des cellules hTERT-HDLEC), et la période de remplacement de celles-ci (4 jours).

Test statistique : Test non paramétrique de Mann-Whitney (* p<0,05 ; par rapport aux cellules CHO ; CHO/pFRT ; CHO-RC)

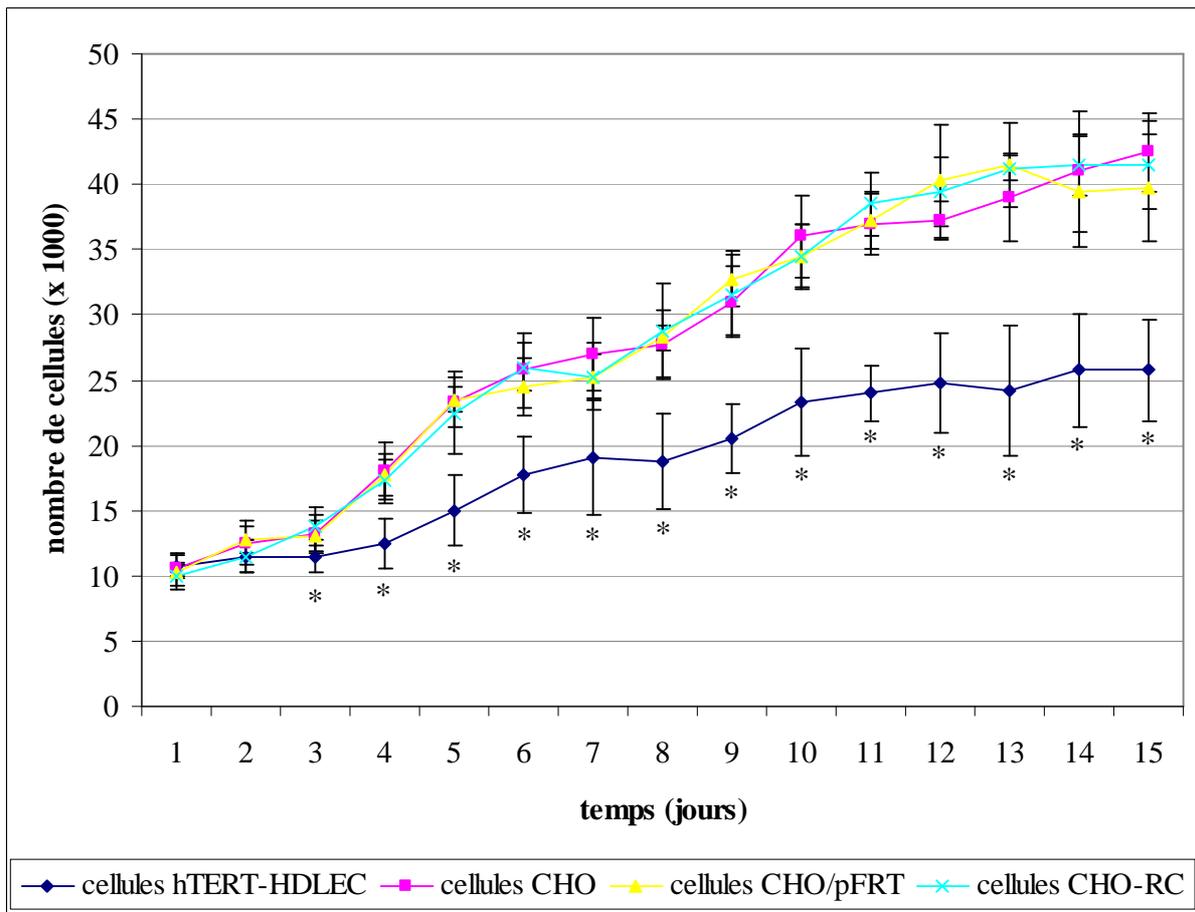


Figure R13 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC, CHO, CHO/pFRT et CHO-RC en présence de VEGF-D (200ng/mL).

Le milieu de culture utilisé est celui requis pour la culture des cellules hTERT-HDLEC, supplémenté par 3% de SVF. Les comptages sont effectués tous les jours par test d'exclusion au bleu de Trypan.

Test statistique : Test non paramétrique de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; par rapport aux cellules CHO ; CHO/pFRT ; CHO-RC)

Cette analyse comparative des courbes de croissance permet de déterminer les conditions optimales des expérimentations de coculture verticale. Les cellules CHO transfectées et non transfectées sontensemencées dans les inserts de coculture 24 heures avant d'être disposées au contact des cellules lymphatiques hTERT-HDLEC. Cette cohabitation est initiée lorsque les cellules hTERT-HDLEC débutent leur phase exponentielle de croissance, soit environ 48 heures après leur ensemencement. Les inserts de coculture sont remplacés tous les quatre jours.

Les contrôles utilisés pour les expérimentations de coculture verticales sont les suivants :

- cellules hTERT-HDLEC en coculture avec cellules CHO non transfectées
- cellules hTERT-HDLEC en coculture avec cellules CHO/pFRT
- cellules hTERT-HDLEC en coculture avec CHO/pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA (plasmide vide) notées CHO-PV
- cellules hTERT-HDLEC seules

Ces témoins sont destinés à vérifier qu'il n'existe pas de différence significative entre la croissance des cellules hTERT-HDLEC seules et celle des cellules hTERT-HDLEC en coculture avec les cellules CHO non transfectées, CHO/pFRT et CHO transfectées par le plasmide vide, toutes ces cellules ne produisant pas les récepteurs circulants hVEGFR-3. De plus, un contrôle supplémentaire a été réalisé pour vérifier que la seule présence des cupules ne pouvait pas être à l'origine d'une perturbation de la croissance des cellules hTERT-HDLEC.

II - 2 - 5 - 1 - Coculture des cellules hTERT-HDLEC et CHO-RC

L'effet des récepteurs circulants hVEGFR-3 produits par les cellules CHO-RC et libérés dans le milieu de culture est évalué au contact des cellules hTERT-HDLEC selon le principe de la coculture verticale au terme d'une période de 15 jours, en présence des facteurs de croissance VEGF-C (Figure R14) et VEGF-D (Figure R15) à la concentration de 200 ng/mL.

L'analyse des puits de coculture témoins permet d'observer que la croissance des cellules hTERT-HDLEC ne se trouve en aucune manière modifiée par la présence des cellules CHO non transfectées, des cellules CHO-pFRT ou des cellules CHO transfectées par le plasmide vide (CHO-PV).

La présence des cellules CHO-RC transfectées par le plasmide recombinant et productrices des récepteurs circulants affecte quant à elle de manière considérable la croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques hTERT-HDLEC. Cette circonstance est observable à partir du 5^{ème} jour et devient significative au 10^{ème} jour dans le cas d'une stimulation par VEGF-C et au 11^{ème} jour dans le cas d'une stimulation par VEGF-D (Test non paramétrique de Mann-Whitney). L'inhibition de croissance des cellules hTERT-HDLEC est alors estimée à 28,5% dans le cas du VEGF-C et de 24,6% dans le cas du VEGF-D au terme du quinzième jour, par comparaison aux puits témoins correspondant à la coculture des cellules hTERT-HDLEC avec les cellules CHO non transfectées. Ce résultat démontre que les récepteurs circulants synthétisés exercent une action inhibitrice sur la croissance des cellules endothéliales lymphatiques *in vitro*, ce qui permet d'établir l'hypothèse d'une interaction avec les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D susceptible d'être à l'origine d'une action inhibitrice sur la lymphangiogenèse.

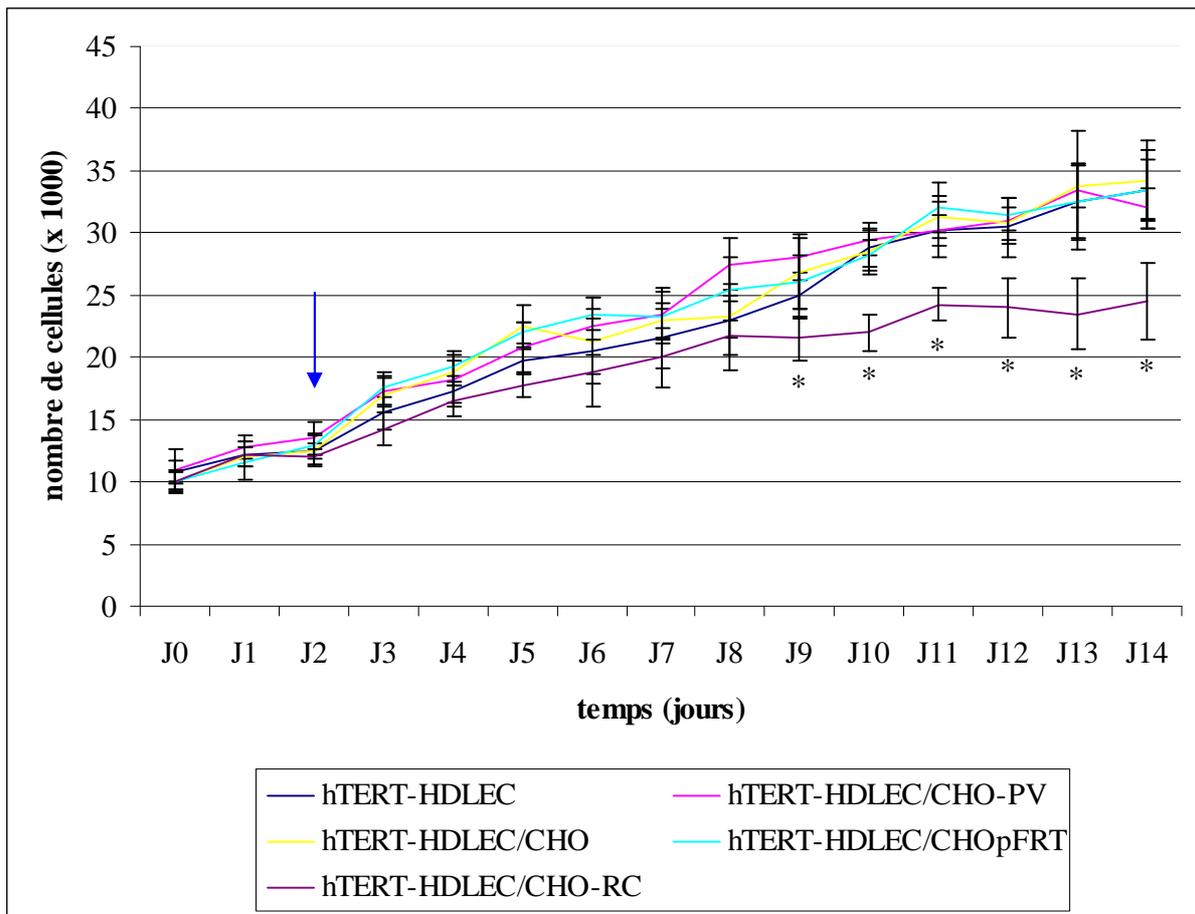


Figure R14 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC en coculture avec les cellules CHO productrices des récepteurs circulants, en présence de VEGF-C (200 ng/mL).

Les inserts de coculture sont mis au contact des cellules hTERT-HDLEC 48 heures après le début de la culture cellulaire des cellules lymphatiques (flèche). Les cellules hTERT-HDLEC seules, hTERT-HDLEC/CHO (non transfectées), hTERT-pFRT et hTERT-HDLEC/CHO-PV (plasmide vide) sont utilisées comme témoins.

Test statistique : Test non paramétrique de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; par rapport aux contrôles hTERT-HDLEC/CHO ; hTERT-HDLEC/CHO-PV ; hTERT-HDLEC/CHO-pFRT)

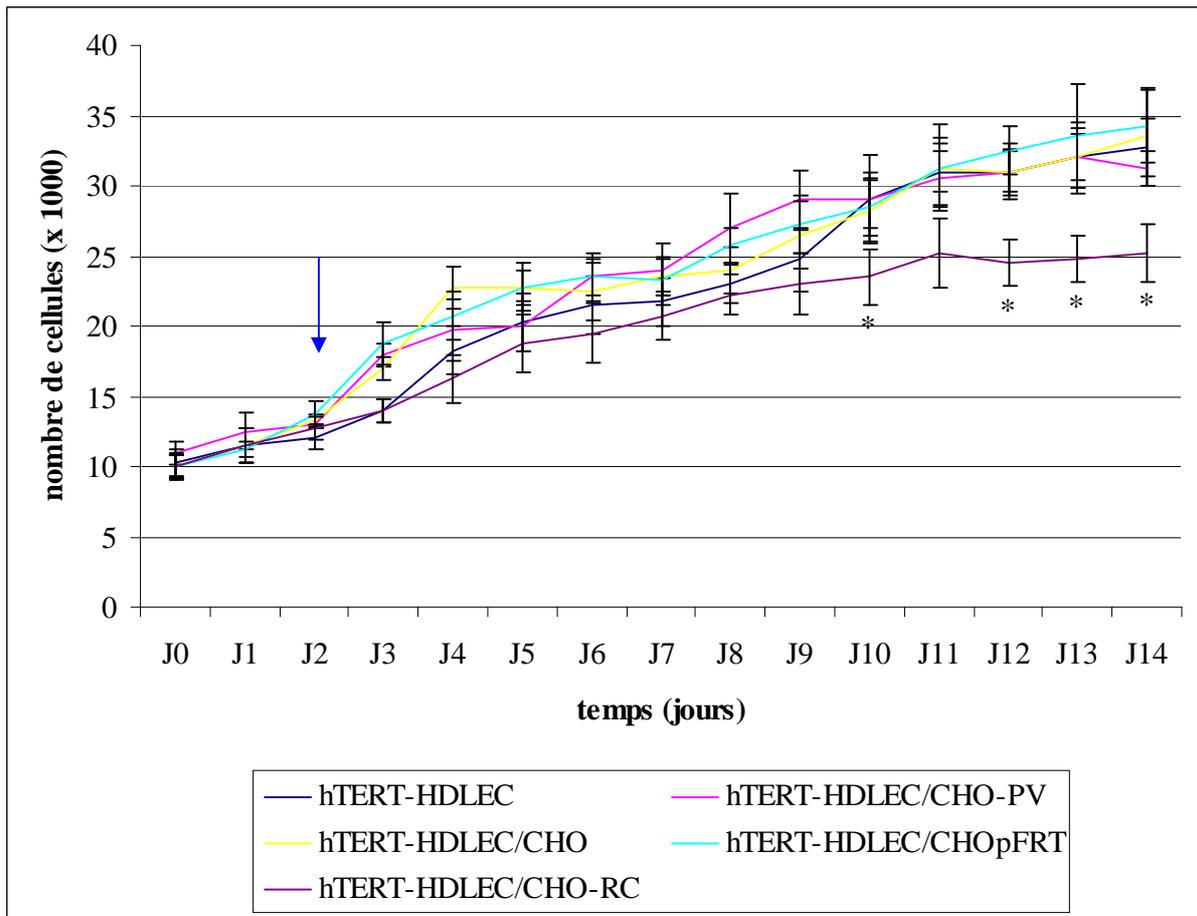


Figure R15 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC en co-culture avec les cellules CHO productrices des récepteurs circulants, en présence de VEGF-D (200 ng/mL).

Test statistique : Test non paramétrique de Mann-Whitney (* $p < 0,05$; par rapport aux contrôles hTERT-HDLEC/CHO ; hTERT-HDLEC/CHO-PV ; hTERT-HDLEC/CHO_{pFRT})

II - 2 - 5 - 2 - Inhibition de la migration cellulaire

La démonstration de l'existence d'une potentialité inhibitrice des récepteurs circulants hVEGFR-3 permet d'envisager l'interruption ou du moins le ralentissement de l'activité migratoire des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques humains en réponse au stimulus tumoral.

Le modèle cellulaire utilisé au cours de ces expérimentations, hTERT-HDLEC, est le même que pour la coculture cellulaire. Ce choix procède principalement de la justification de résultats homogènes et cohérents quant à l'analyse comparative des paramètres physiologiques pris en considération dans cette étude.

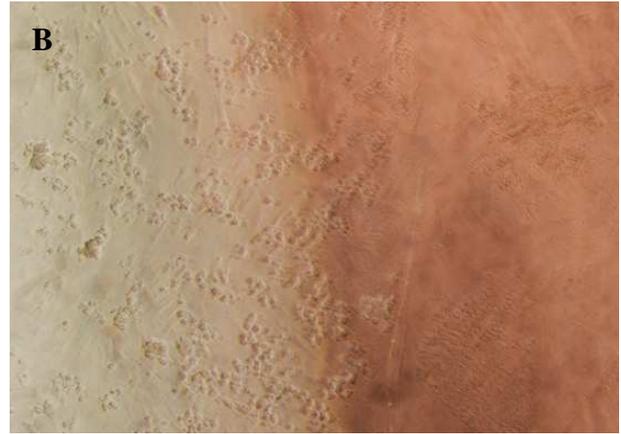
La capacité migratoire des cellules hTERT-HDLEC est évaluée en testant l'aptitude des cellules à se déplacer au travers d'une mince paroi d'agarose, en réponse à un stimulus placé de l'autre côté de la paroi. Les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D sont de nouveau utilisés pour reproduire le stimulus tumoral.

Dans cette expérimentation, la capacité inhibitrice des récepteurs circulants est évaluée par la mise en interaction des facteurs de croissance avec les protéines recombinantes sécrétées par les cellules CHO-RC. L'inhibition est jugée effective dans le cas où cette interaction réduit ou annule la faculté des cellules lymphatiques à traverser la fine paroi d'agarose.

Une première vérification a consisté à contrôler d'une part que les cellules hTERT-HDLEC sont effectivement capables de traverser la paroi d'agarose en réponse à un stimulus trophique, et d'autre part que ce déplacement orienté peut être visualisé par les techniques de microscopies classiques. Ce premier résultat est rapporté sur la figure R16. On y observe un déplacement des cellules lymphatiques vers le puits contenant une concentration élevée de sérum de veau fœtal (Figure R16 A), tandis qu'aucune cellule n'est trouvée dans le puits témoin contenant du milieu minimum non supplémenté (Figure R16 B).



sans VEGF-C



avec VEGF-C

hTERT-HDLEC

Figure R17 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200 ng/mL).



avec VEGF-C



avec VEGF-C + RC

hTERT-HDLEC

Figure R18 : Inhibition de la migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200ng/mL) par les récepteurs circulants.

De manière comparable, nous avons vérifié la réponse au facteur de croissance VEGF-D, à la même concentration (200 ng/mL). On constate également une migration importante des cellules vers le facteur de croissance (Figure R19 B), alors que la traversée de la paroi d'agarose n'a pas lieu en absence de VEGF-D (Figure R19 A). Les effets d'une adjonction de récepteurs circulants sont observés sur les clichés suivants et montrent une inhibition partielle de la migration cellulaire. Ainsi, le nombre de cellules lymphatiques ayant franchi la paroi d'agarose est inférieur de 47,1% dans le puits contenant le VEGF-D neutralisé par les récepteurs circulants (Figure R20 B) par rapport au puits contenant le VEGF-D libre (Figure R20 A).

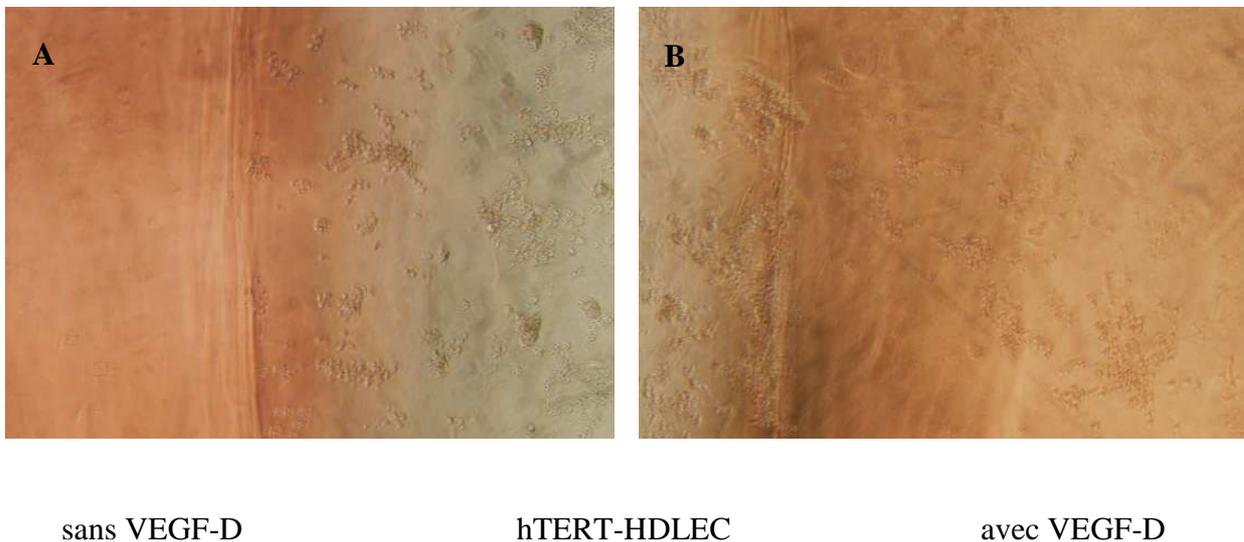
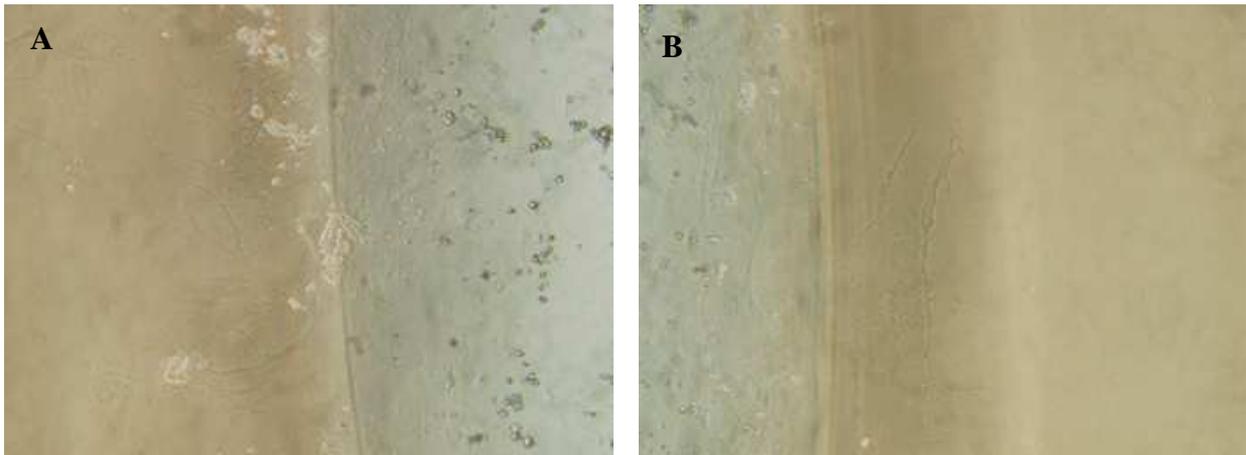


Figure R19 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL).

Par ailleurs une série a pu être exploitée pour quantifier le déplacement des cellules lymphatiques dans les deux cas. Lorsque le facteur de croissance VEGF-D est utilisé seul, on mesure un déplacement des cellules de 187 μm (Figure 20 A). Dans le cas d'une inhibition par les récepteurs circulants, ce déplacement est réduit à 72 μm (Figure 20 B) (Logiciel Lucia 5).



avec VEGF-D

hTERT-HDLEC

avec VEGF-D + RC

Figure R20 : Inhibition de la migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200ng/mL) par les récepteurs circulants.

Une première série de contrôles a été effectuée en substituant le produit de sécrétion des cellules CHO-RC (productrices des récepteurs circulants) par le produit de sécrétion des cellules CHO non transfectées (non productrices des récepteurs circulants). Les déplacements cellulaires ont alors été comparés dans le cas de la présence ou de l'absence de ces suppléments.

Dans le cas d'une stimulation par le VEGF-C, à la concentration de 200 ng/mL, on observe un passage des cellules hTERT-HDLEC dans les deux directions (Figures R21 A et B).

Dans le cas d'une stimulation par le VEGF-D, dans des conditions comparables, le même résultat est constaté (Figures R22 A et B).



avec VEGF-C



hTERT-HDLEC

avec VEGF-C + SNT

Figure R21 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO non transfectées : SNT).



avec VEGF-D



hTERT-HDLEC

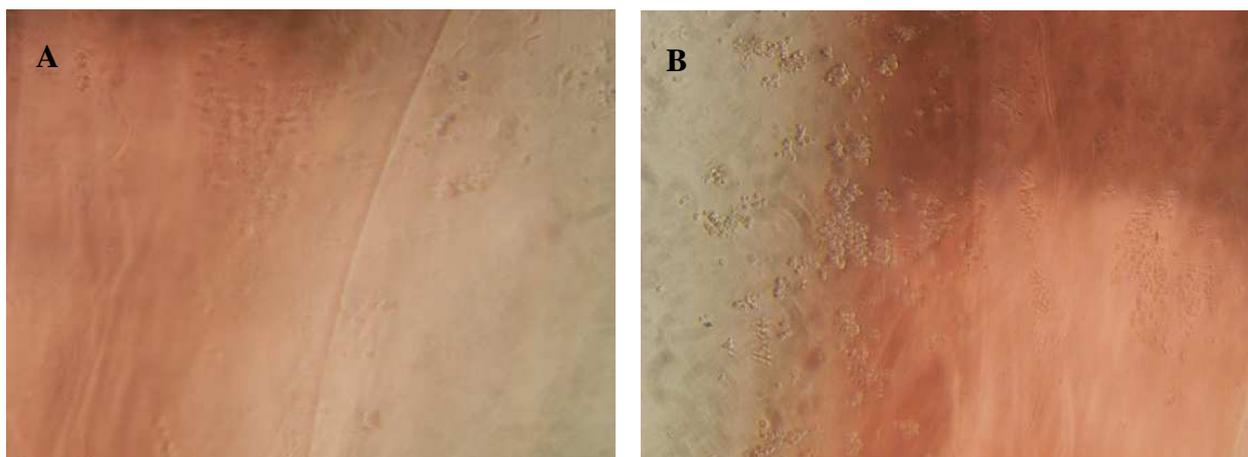
avec VEGF-D + SNT

Figure R22 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO non transfectées : SNT).

Une seconde série de contrôles est réalisée dans le but de confirmer ou de discuter les résultats précédents. Elle consiste à utiliser cette fois dans le milieu de culture le produit de sécrétion de cellules CHO ayant été transfectées par le plasmide vide et de comparer les mouvements cellulaires par rapport à un milieu de culture contenant le milieu conventionnel.

Dans le cas d'une stimulation le facteur de croissance VEGF-C à 200 ng/mL, la migration des cellules vers le milieu normal (Figure R23 A) est comparable à celle du milieu contenant le produit de sécrétion des cellules transfectées par le plasmide vide (Figure R23 B).

Un résultat analogue est obtenu avec une stimulation par le VEGF-D (Figures R24 A et B).



avec VEGF-C

hTERT-HDLEC

avec VEGF-C + PV

Figure R23 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).

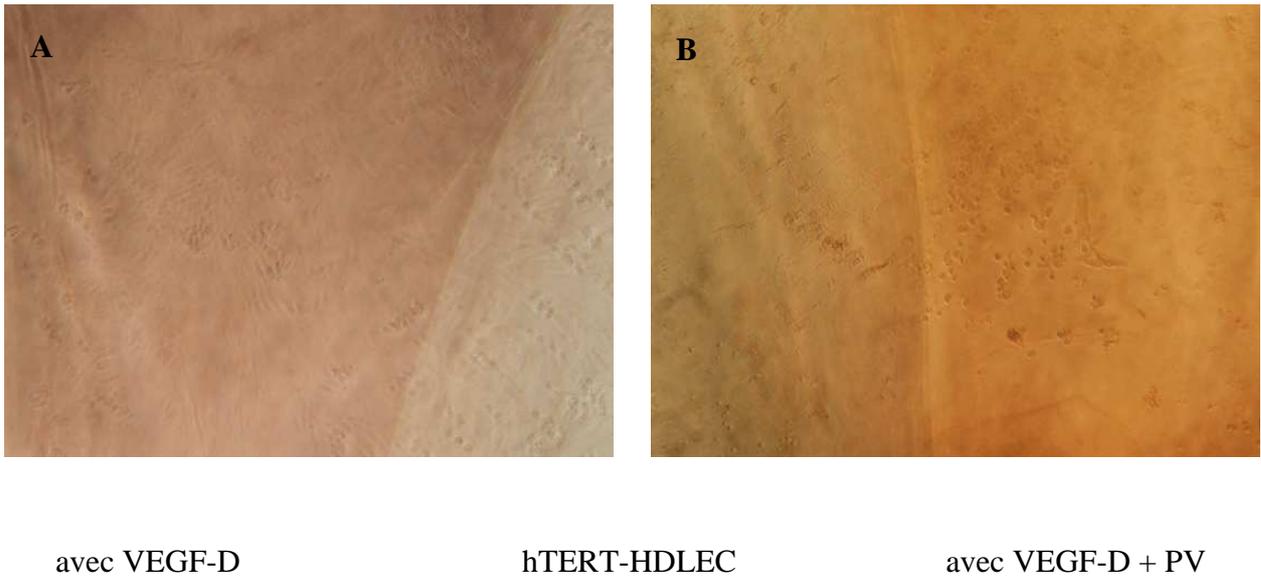


Figure R24 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).

Une première analyse de ces expérimentations permet de déduire que l'activité migratoire des cellules endothéliales lymphatiques humaines hTERT-HDLEC induite et orientée par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D est modérée ou ralentie par la présence inhibitrice des récepteurs circulants.

Pour des raisons de temps, les expériences relatées ci-dessus n'ont pas pu être réalisées en séries suffisantes pour les soumettre à l'analyse statistique ni pour confirmer leur reproductibilité. Ces écueils seront toutefois rectifiés dans une publication en fin d'élaboration concernant ce travail et dont les principes généraux sont rapportés en annexe.

II - 2 - 5 - 3 - Inhibition de la formation des tubules lymphatiques

L'initiation de la formation des néo-vaisseaux lymphatiques débute par l'organisation des cellules de l'endothélium de ces vaisseaux en tubules. Cette disposition est normalement acquise à la suite d'une activation biochimique par les cytokines VEGF-C et VEGF-D.

Une étape supplémentaire importante dans la mise au point d'une stratégie anti-lymphangiogénique consiste à parvenir à la déstructuration de la formation de ces éléments vasculaires originels au moyen des récepteurs circulants hVEGFR-3.

Dans les conditions de culture normales, les cellules de l'endothélium des vaisseaux d'origine humaine hTERT-HDLEC évoluent sur un support composé de gélatine à 1% facilitant l'ancrage de la matrice extra-cellulaire. Elles présentent alors une morphologie allongée, fusiforme, avec parfois une ou plusieurs ramifications qui peuvent émettre leur prolongement à une distance équivalent à environ une fois la taille de la cellule (Figure R25). Dans ces conditions, la reproduction expérimentale des formations tubulaires n'est pas possible.

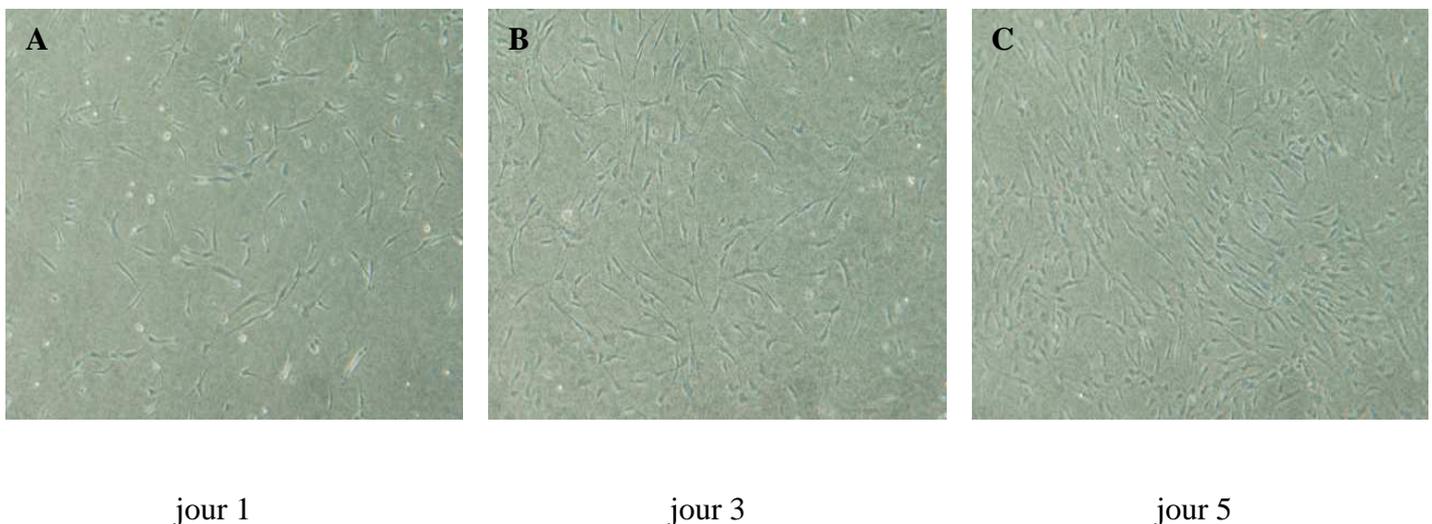


Figure R25 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de gélatine.

L'induction de la formation des tubules exige deux conditions : la nature collagénique du support et la présence de cytokine. Le seul remplacement de la matrice de gélatine par une matrice de collagène ne suffit pas à la formation des tubes et préserve une organisation en tapis des cellules hTERT-HDLEC (Figure R26).

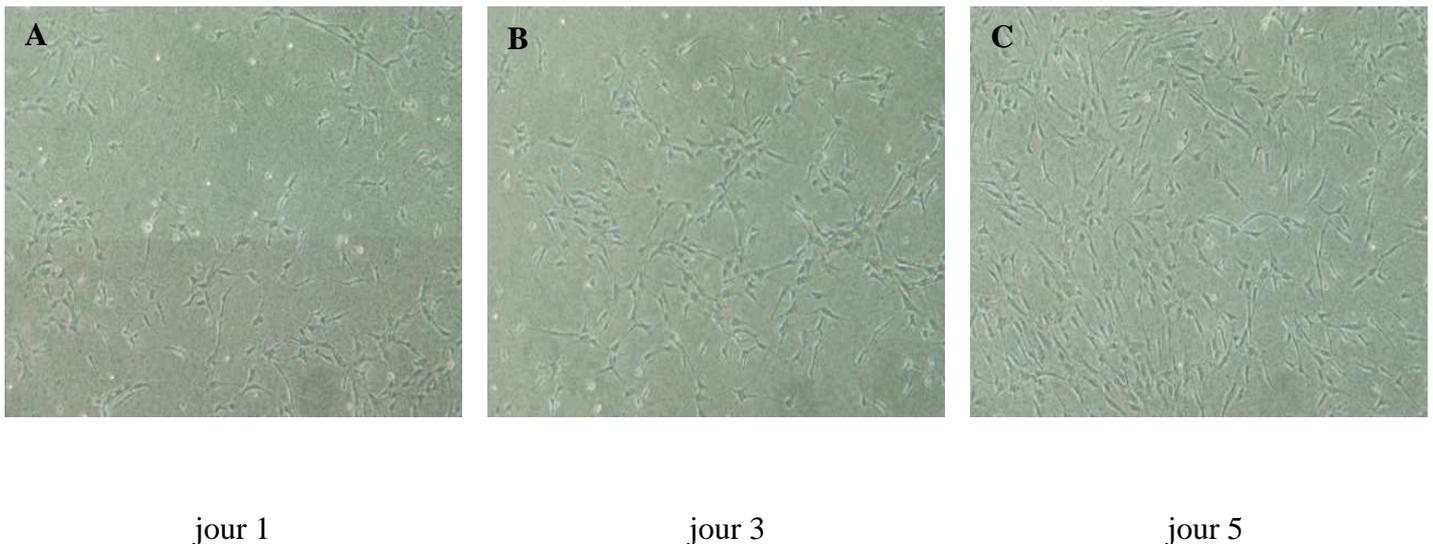
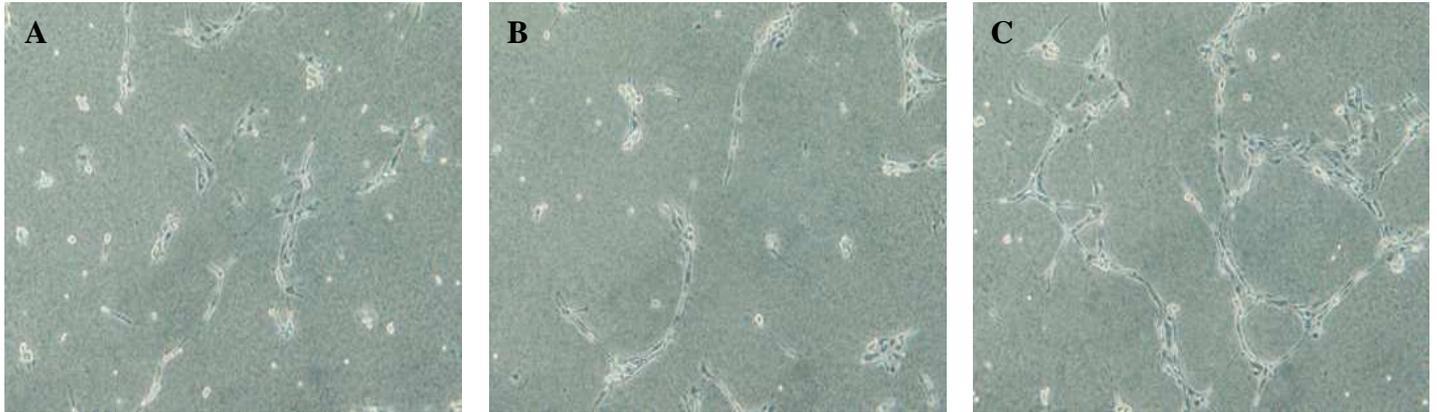


Figure R26 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène.

L'addition du facteur de croissance VEGF-A, pourtant non spécifique de l'activation des synthèses vasculaires lymphatiques, a cependant été pratiquée dans le but de démontrer que l'action cytokinique échappe pour partie à la spécificité des voies de transduction au bénéfice d'un mécanisme plus global. Le facteur de croissance a été utilisé à la concentration optimale que nous avons estimée à 150 ng/mL. Les conditions définies laissent entrevoir la formation de structures d'aspect tubulaire dès le premier jour après l'ensemencement des cellules lymphatiques. Ce résultat est confirmé dans les jours suivants (Figure R27).



jour 1

jour 3

jour 5

Figure R27 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-A (150 ng/mL).

Les conditions de la culture cellulaire sont reproduites à l'identique pour observer l'impact d'une adjonction de récepteurs circulants dans le milieu de culture des cellules hTERT-HDLEC complémenté par le VEGF-A. L'organisation des cellules lymphatiques se construit d'une manière proche de celle précédemment décrite sans les récepteurs circulants. Des structures comparables à des tubules lymphatiques apparaissent dans les premiers jours de la culture des cellules mais les alignements cellulaires sont plus diffus, moins allongés et évoquent d'une manière moins éloquente la formation de vaisseaux naissants (Figure R28).

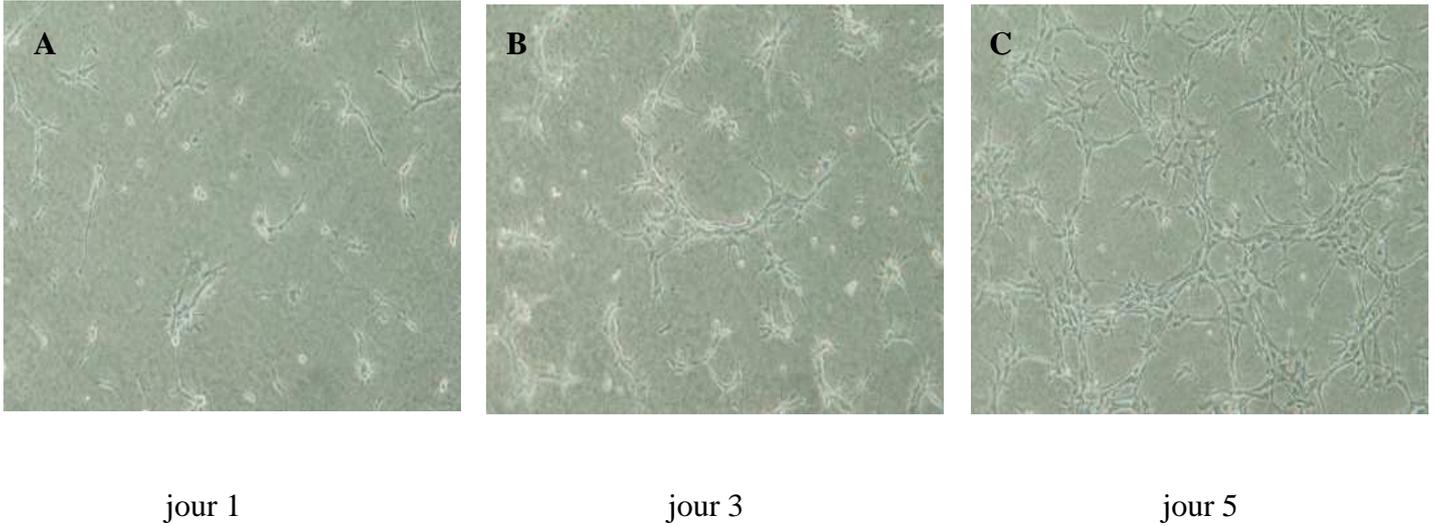


Figure R28 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-A (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.

L'expérience a été renouvelée en utilisant cette fois des paramètres plus spécifiquement en adéquation avec l'activation du processus lymphangiogénique. Le facteur de croissance VEGF-C, à la même concentration, a été utilisé pour induire l'organisation des cellules endothéliales lymphatiques en tubules. Il en résulte dès le premier jour après l'ensemencement des cellules hTERT-HDLEC sur la matrice de collagène un alignement des cellules lymphatiques dont la morphologie évolue progressivement vers une forme allongée en établissant des contacts à distance. Ces modifications morphologiques et structurelles des cellules endothéliales sont confirmées dans jours suivants pour atteindre l'aspect de tubules distinctement constitués (Figure R29).

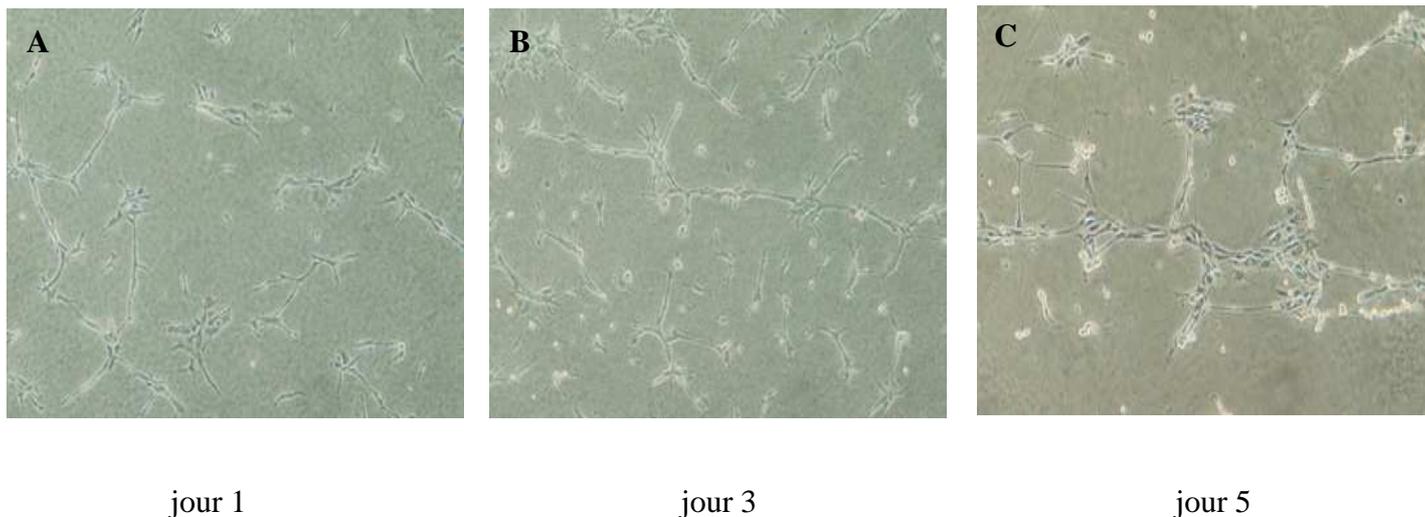


Figure R29 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-C (150 ng/mL).

Un essai d'inhibition de l'activation de ces modifications par le VEGF-C à 150 ng/mL est réalisé avec les récepteurs circulants hVEGFR-3. Il met en évidence une forte différence avec le cas de l'activation par le VEGF-C décrit précédemment. L'aspect d'une croissance cellulaire en tapis est clairement conservé et les cellules lymphatiques, si elles évoluent très légèrement vers une morphologie plus allongée, ne s'assemblent pas en tubules, ni ne s'organisent selon quelque forme d'alignement (Figure R30).

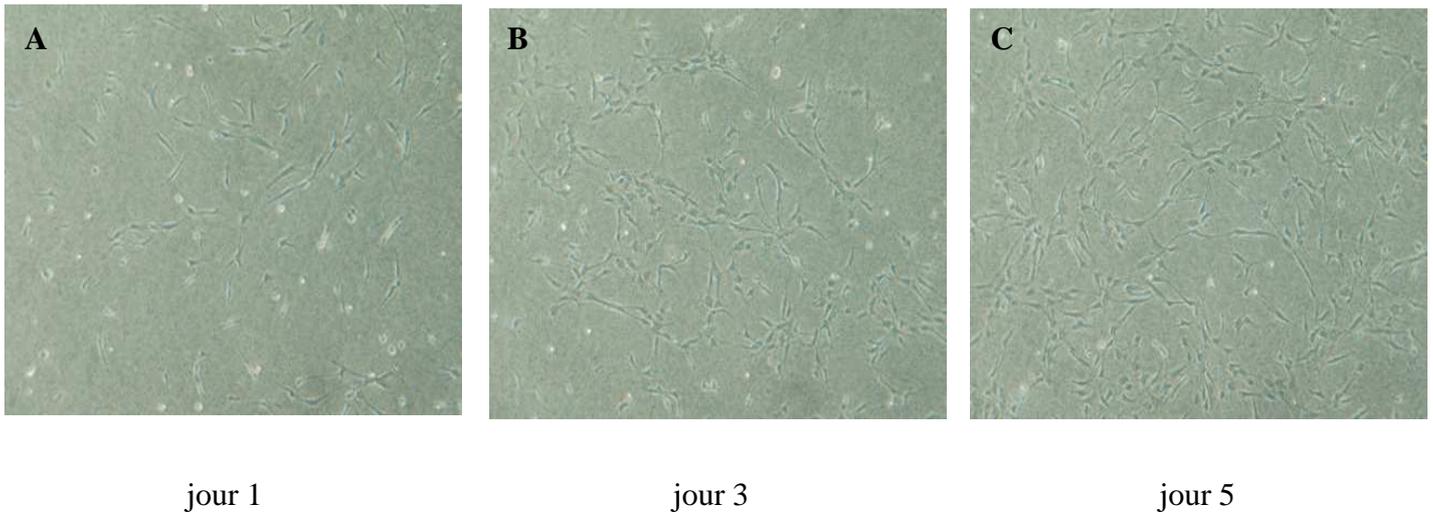


Figure R30 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-C (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.

L'utilisation du facteur de croissance VEGF-D à 150 ng/mL pour induire la formation des tubules lymphatiques aboutit à un résultat plus accompli. L'organisation des cellules lymphatiques tend nettement vers une morphologie tubulaire dès le début de l'expérience pour se confirmer progressivement. Au cinquième jour, d'épais tubules distinctement définis parcourent intégralement la surface du support collagénique (Figure R31).

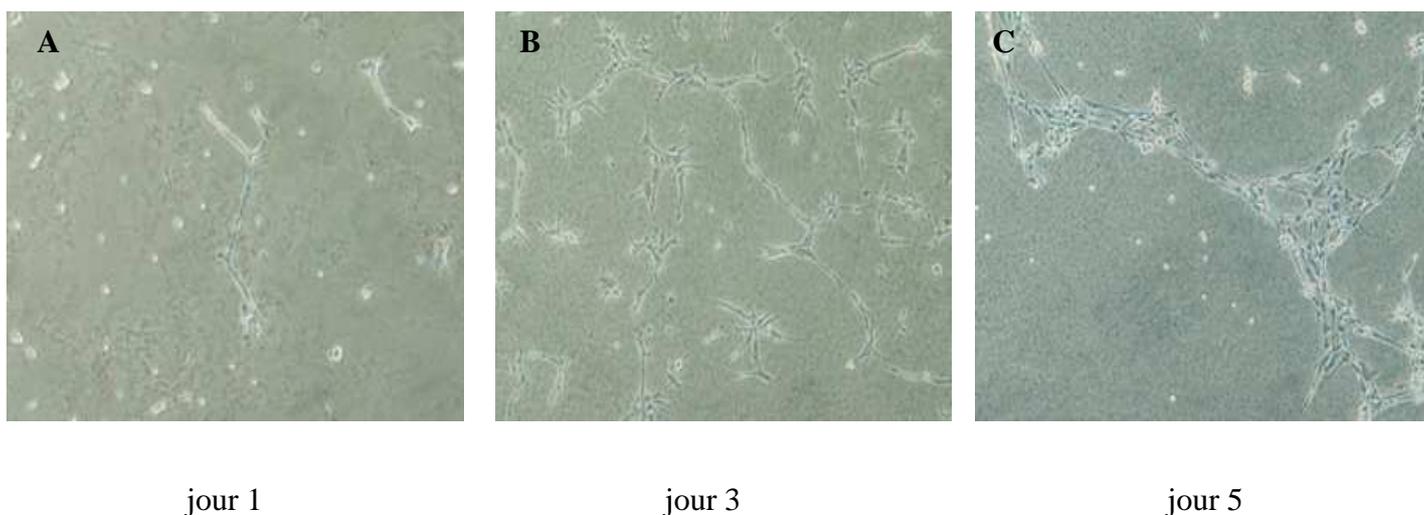
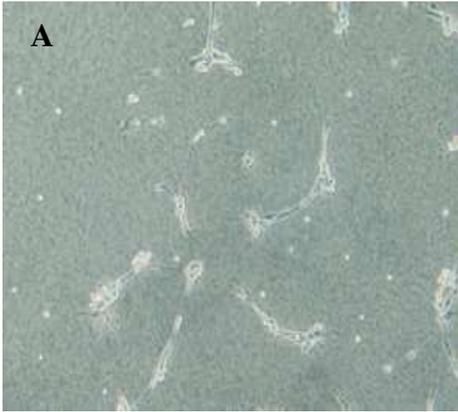
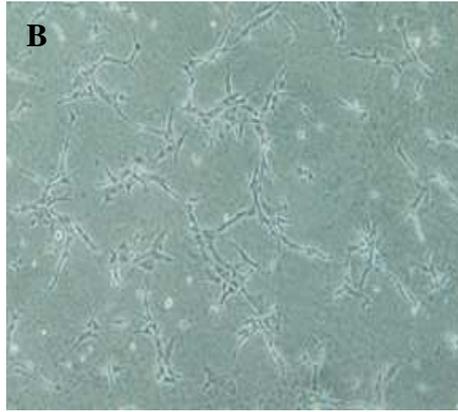


Figure R31 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-D (150 ng/mL).

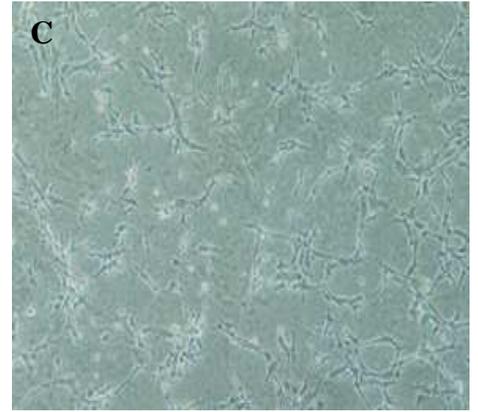
Le cas de l'utilisation de VEGF-D pour induire la formation des tubules lymphatiques s'est donc avéré particulièrement intéressant pour réaliser les essais d'une hypothétique inhibition de ces arrangements cellulaires par les récepteurs circulants. L'observation indique aux stades précoces de l'expérience un début d'organisation selon des alignements cellulaires non perturbés à priori par l'action des récepteurs circulants. Cette tendance n'est cependant pas confirmée par la suite. A partir du quatrième et du cinquième jour après le début de l'expérimentation, les cellules lymphatiques humaines hTERT-HDLEC couvrent progressivement la surface du support de manière homogène, et les formations pseudo-tubulaires observées initialement s'estompent. Aucune formation tubulaire n'est distinctement visible (Figure R32).



jour 1

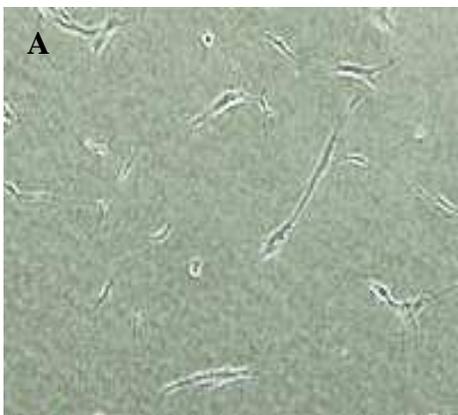


jour 3

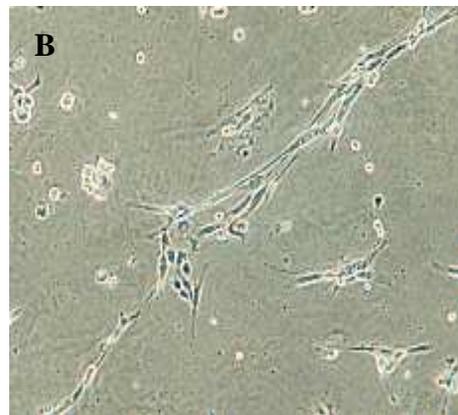


jour 5

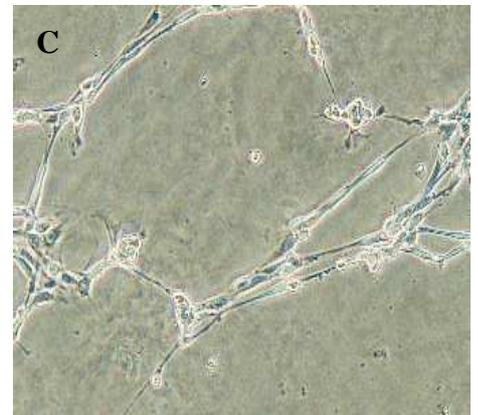
Figure R32 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-D (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.



jour 1



jour 3



jour 5

Figure R33 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène en présence de VEGF-D (150 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).

Un contrôle est réalisé à partir du surnageant des cellules transfectées avec le vecteur vide (CHO-PV)(Figure R33). Il permet de constater que l'organisation des structures vasculaires lymphatiques naissantes n'est pas perturbée dans ces conditions ce qui élimine l'hypothèse d'un effet non spécifique du surnageant issu de la culture des cellules CHO.

Il est donc possible de conclure, aux vues des observations et résultats obtenus au terme de ces expérimentations, que l'association d'un support de type collagénique et de la présence de facteurs de croissance permet l'induction de structures pré-vasculaires à partir de cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques humains. Cette induction semble être la conséquence d'un mécanisme général, mais est activée plus fortement par les facteurs de croissance spécifiques des vaisseaux lymphatiques. On observe par ailleurs que VEGF-D pourrait être un meilleur inducteur de ce processus que VEGF-C dans les mêmes conditions.

De plus, l'introduction de récepteurs circulants hVEGFR-3 dans le milieu de culture est à l'origine d'un effet s'opposant à ces événements cellulaires. La formation des tubules lymphatiques à partir des cellules endothéliales est alors contrariée. Ces observations vont d'une part dans le sens de l'hypothèse d'une fixation effective des récepteurs circulants sur VEGF-C et VEGF-D, mais également VEGF-A, et d'autre part confirment le caractère inhibiteur de cette interaction.

II - 2 - 5 - Etude de l'expression de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 dans différentes lignées tumorales

Contrairement aux facteurs VEGF-C ou VEGF-D, dont l'expression a été mise en évidence dans plusieurs types de cellules cancéreuses, l'expression de leur récepteur VEGFR-3 semble restreinte aux cellules endothéliales en rapport avec le processus lymphangiogénique, qu'il soit physiologique ou pathologique. A l'heure actuelle, ces affirmations sont quelque peu controversées puisqu'il a été montré que certaines cellules de phénotype tumoral expriment également VEGFR-3. C'est notamment le cas des cellules leucémiques HEL, utilisées comme source d'ARNm VEGFR-3 pour le clonage de notre séquence d'intérêt.

Afin de participer à la discussion concernant l'expression de VEGFR-3, les taux d'ARNm de VEGFR-3 d'une part, et de ses ligands VEGF-C et VEGF-D d'autre part, ont été mesurés dans 16 lignées cellulaires cancéreuses humaines et dans les lymphocytes T, par RT-PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR). Cette méthode permet de déterminer la concentration en ADNc d'intérêt d'un échantillon par comparaison avec une gamme étalon d'amplification. Dans cette étude, nous utiliserons le terme de « codance » pour définir le niveau d'expression d'un gène dans un type cellulaire particulier. Ainsi, on parlera de codance nulle dans le cas d'un gène silencieux, plutôt que de le décrire comme un gène ayant un niveau d'expression nul. A l'opposé, la forte codance d'un gène caractérisera un gène dont le niveau d'expression cellulaire est important.

Nous avons établi 4 gammes étalons : Trois concernent l'amplification des gènes d'intérêt VEGFR-3, VEGF-C et VEGF-D et l'autre l'amplification du gène de référence G6PDH permettant de normaliser l'expression. Afin de réduire les erreurs éventuelles de manipulation, les quatre gammes ont été établies à partir du même lot d'ADNc, provenant d'un type cellulaire exprimant les quatre ARNm. Parmi les 17 types cellulaires testés, seules les cellules de carcinome pulmonaire A549 réunissaient tous les critères d'expression. Les résultats de l'amplification des ADNc purs ou dilués en série sont présentés dans le tableau R1.

	pur	d10	d100	d1000	d10000	efficacité
VEGF-C	21,29	24,77	28,17	30,87	33,55	2,1
	21,28	24,45	27,84	30,81	33,90	
moyenne	21,28 ± 0,01	24,61±0,23	28,00±0,23	30,84±0,04	33,73±0,25	
VEGF-R3	24,99	28,33	31,66	35,14		1,97
	25,17	28,48	31,87	35,50		
moyenne	25,08±0,13	28,41±0,11	31,77±0,15	35,32±0,25		
VEGF-D	26,79	29,63	34,07	36,82		1,98
	26,74	29,63	33,20	36,57		
moyenne	26,77±0,04	29,63±0,00	33,64±0,62	36,70±0,18		
G6PDH	15,75	19,64	23,22	26,89	31,00	1,84
	15,74	19,59	23,28	26,86	30,91	
moyenne	15,75±0,01	19,62±0,04	23,25±0,04	26,88±0,02	30,96±0,06	

Tableau R1 : Valeurs des « crossing-points » (Cp) pour chaque gène en fonction de la concentration en ADNc.

Chaque mesure est effectuée 2 fois. L'efficacité de chaque amplification est estimée par la formule : $efficacité = 10^{-1/pente}$.

Comme le montrent les écart-types calculés pour chaque concentration d'ADNc (Tableau R1), la manipulation est hautement reproductible, même pour les dilutions les plus faibles. Il faut noter également que s'il est possible d'amplifier à la dilution 1/10000^{ème} pour VEGF-C et G6PDH (Figure R34), l'amplification limite survient pour la dilution 1/1000^{ème} dans le cas de VEGFR-3 et de VEGF-D (Figure R35).

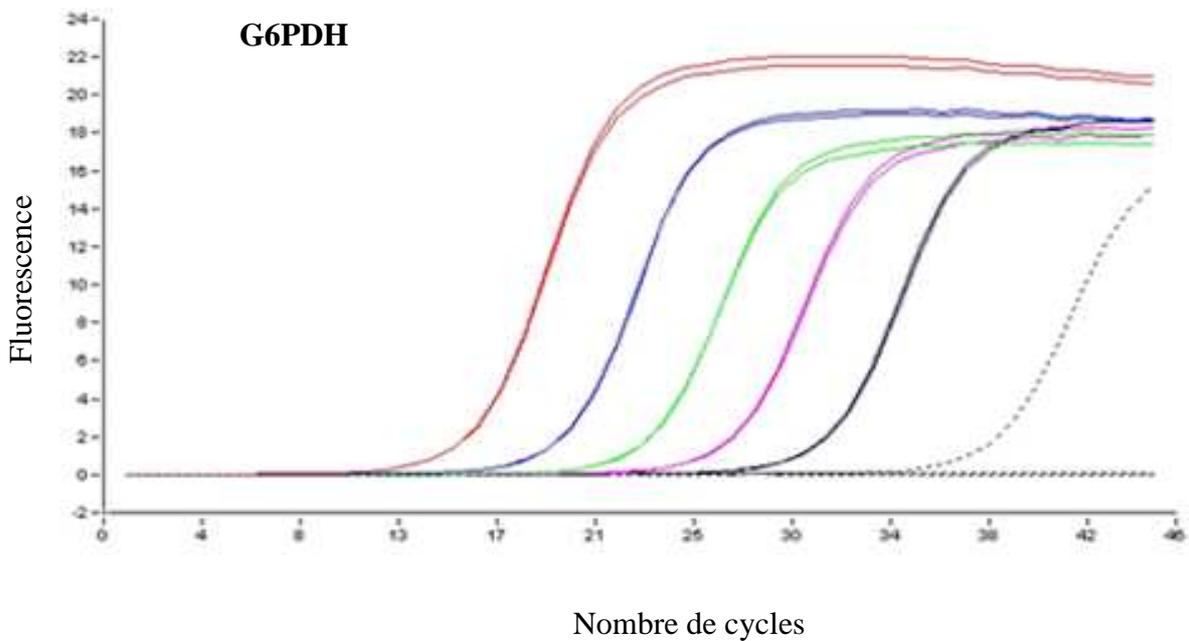
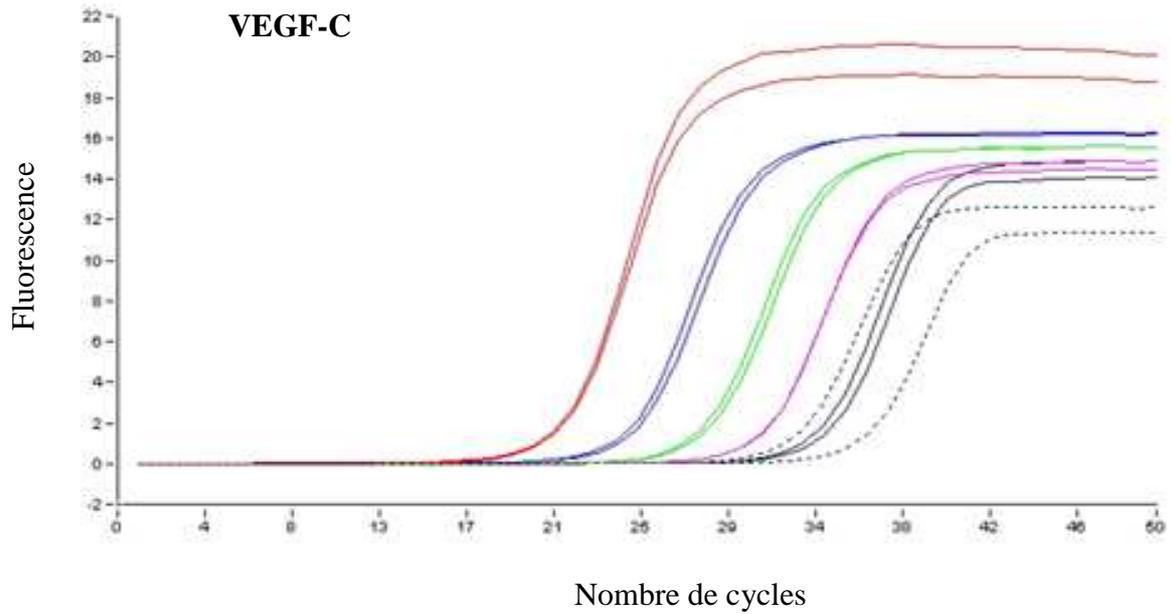


Figure R34 : Gammes d'amplification par RT-PCR quantitative des ADNc obtenus à partir des ARNm de cellules A549.

Les amorces spécifiques de VEGFR-3 et de VEGF-C sont utilisées pour l'amplification des ADNc pur (courbes rouges), dilués au 1/10^{ème} (courbes bleues), au 1/100^{ème} (courbes vertes), au 1/1000^{ème} (courbes violettes) et au 1/10000^{ème} (courbes noires, traits pleins). Les contrôles de la PCR sont représentés par des courbes en pointillés.

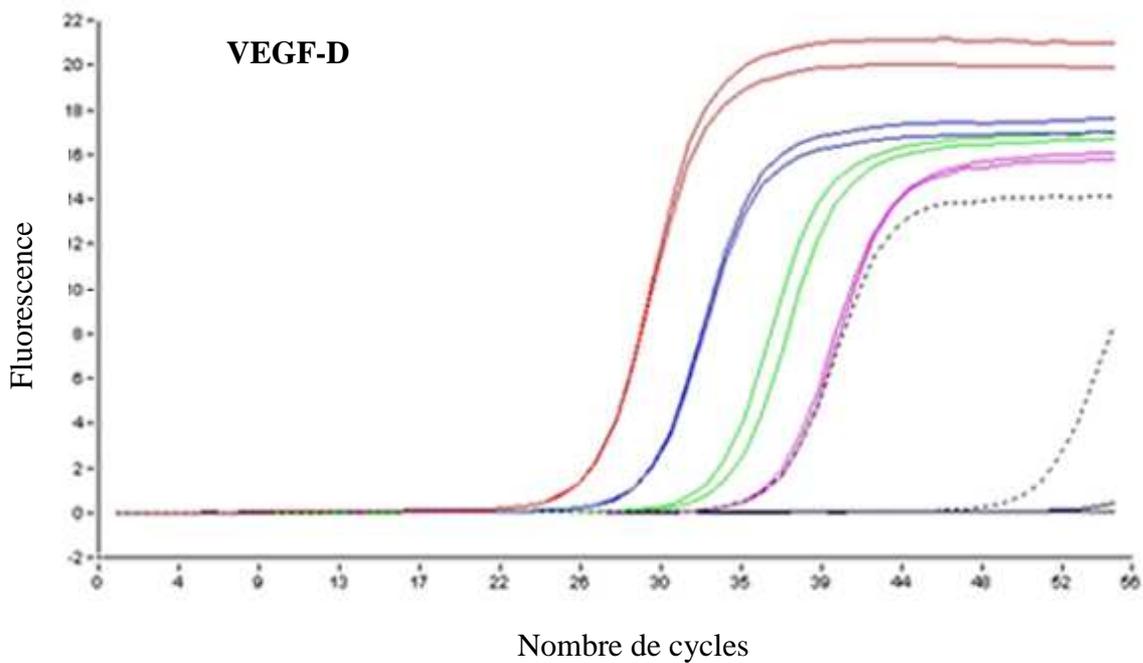
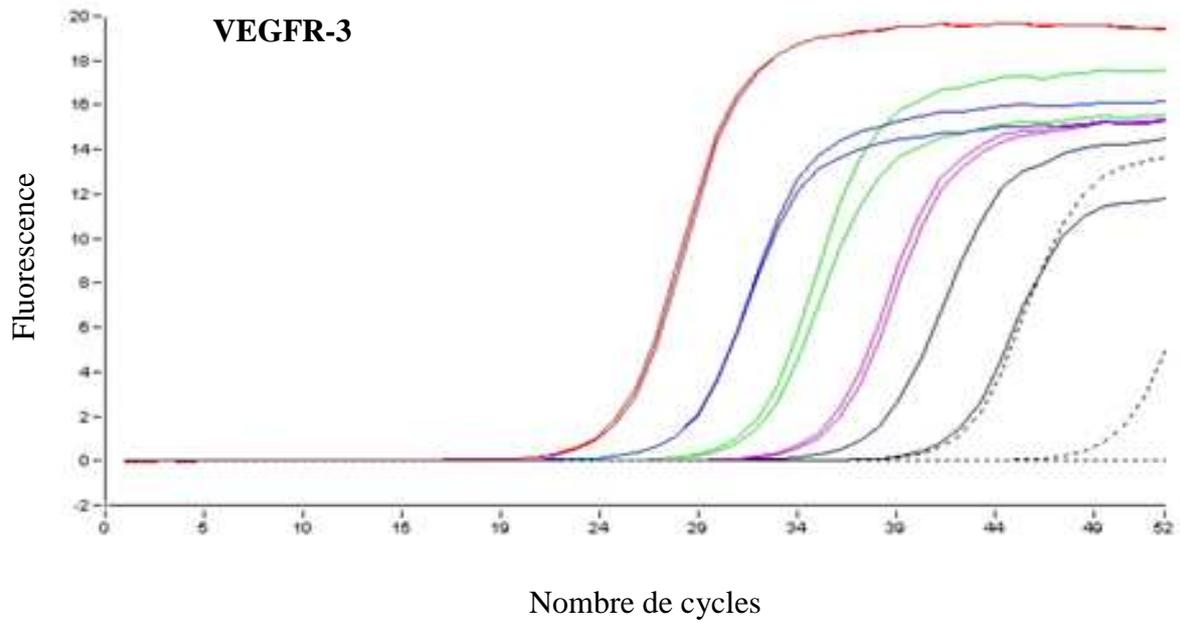
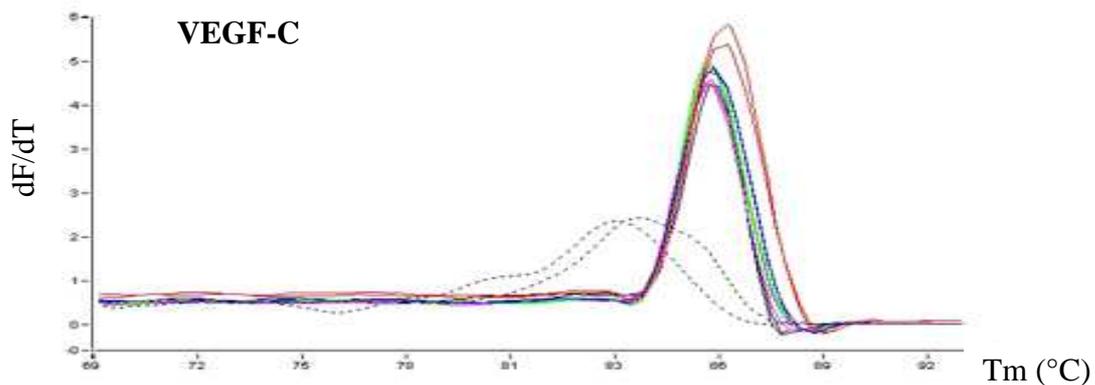
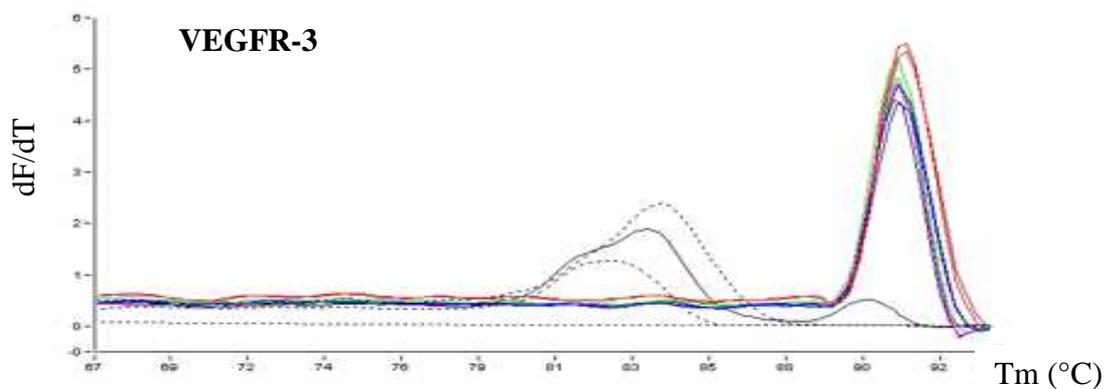


Figure R35 : Gammes d'amplification par RT-PCR quantitative des ADNc obtenus à partir des ARNm de cellules A549.

Les amorces spécifiques de VEGF-D et de G6PDH sont utilisées pour l'amplification des ADNc pur (courbes rouges), dilués au 1/10^{ème} (courbes bleues), au 1/100^{ème} (courbes vertes),

au $1/1000^{\text{ème}}$ (courbes violettes) et au $1/10000^{\text{ème}}$ (courbes noires, traits pleins). Les contrôles de la PCR sont représentés par des courbes en pointillés.

L'avantage de la RT-PCR quantitative est qu'il est possible de s'assurer de la spécificité de l'amplification en réalisant une courbe de fusion. La figure R36 montre que chaque ADNc présente un pic unique quelque soit sa dilution et que l'amplification observée pour les contrôles est uniquement due à la présence de dimères (comparaison des figures R34 et R35 avec la figure R36).



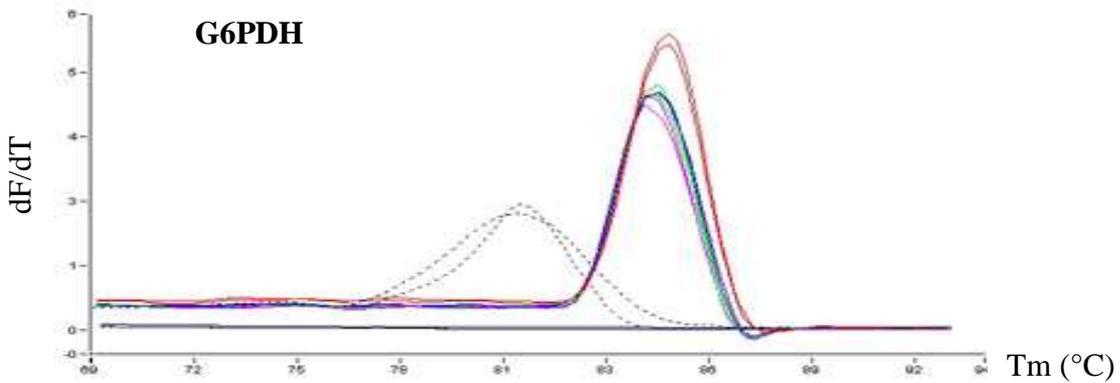
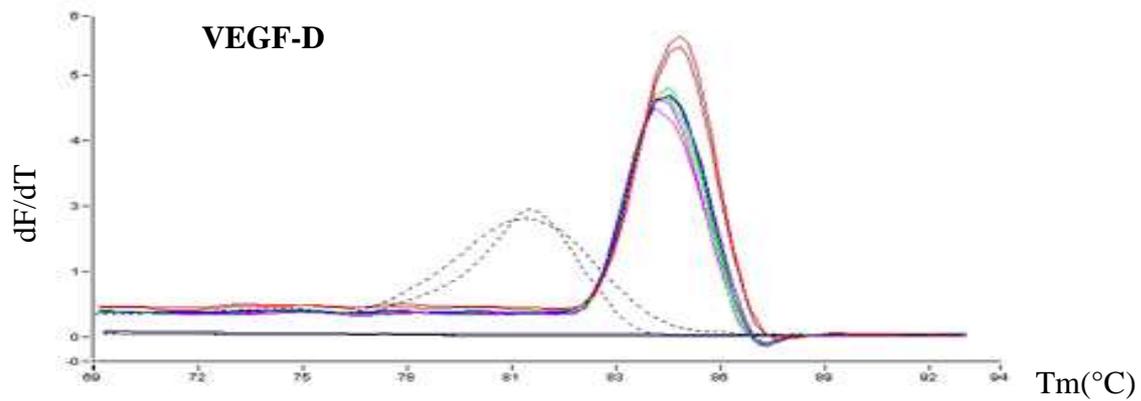


Figure R36 : Courbes de fusion caractéristiques de l'ADNc amplifié.

Le pic caractéristique de chaque ADNc amplifié est obtenu en effectuant la dérivée première de la fluorescence. Une brusque chute de fluorescence est observée lorsque l'ADN double est dénaturé, au moment où la température critique spécifique de l'ADN, appelée température de fusion, est atteinte.

Lorsque les courbes étalons sont validées et enregistrées, le logiciel de quantification relative permet le calcul d'une série de coefficients correspondants, réunissant les caractéristiques des gammes du gène d'intérêt et du gène de référence. A chaque

amplification, l'utilisation d'un calibrateur, dans notre cas l'ADNc des cellules A549, permet le repérage relatif à la série de coefficients et par conséquent aux gammes.

Les résultats que nous avons obtenus montrent des différences notables dans l'expression de VEGFR-3 d'une part et l'expression de ses ligands d'autre part (Tableau 4). Les différences les plus importantes sont trouvées au niveau de l'expression de VEGFR-3. Dans 6 des 17 types cellulaires étudiés, aucune expression de l'ARNm de VEGFR-3 n'a été mise en évidence. Dans les autres cellules, l'expression varie d'un taux négligeable pour les 4 types de mélanomes notamment (T1P26, M1Dor, M3Dau et M4Beu) à un niveau d'expression plus élevé dans le cas des cellules A549, et des cellules sanguines normales (lymphocytes T) mais surtout tumorales, comme les cellules Molt4, Jurkat, ou plus particulièrement HEL.

Nous avons en revanche mis en évidence que toutes les cellules expriment l'ARNm de VEGF-D, à des taux plus ou moins élevés, les cellules d'adénocarcinome primaire du colon (SW480 : 9,61 U.R.A) exprimant environ 640 fois plus l'ARNm de VEGF-D que les cellules Jurkat (0,015 U.R.A). D'une manière assez surprenante, l'ARNm de VEGF-C n'est quant à lui pas exprimé dans toutes les cellules. Il présente par ailleurs d'importantes différences d'expression selon les types cellulaires, la plus forte étant mesurée dans le cas des cellules de carcinome mammaire MDA-MB-231 (17,87 U.R.A).

Il faut de plus noter qu'il existe une corrélation négative significative entre l'expression de l'ARNm de VEGF-D et celle de l'ARNm de VEGFR-3 ($r^2 = - 0,705$; $p = 0,03$; test non paramétrique de corrélation des rangs de Spearman). Par contre aucune corrélation significative n'a été trouvée entre VEGF-C et VEGFR-3 ($r^2 = - 0,476$; $p = 0,21$) ou entre VEGF-D et VEGF-C ($r^2 = - 0,316$; $p = 0,3$).

cellules	VEGF-D	VEGF-C	VEGFR-3
A549	1	1	1
HEL	0,06	0,000685	53,695
lymphoT	0,06	0,24	0,47
Molt4	0,025	-	4,595
Jurkat	0,015	-	3,79
T24	0,31	2,055	-
WiDr	1,125	-	-
HT29	1,69	-	-
SW480	9,61	0,005	-
SW620	2,56	0,000335	-
SHSY5Y	2,585	0,000785	-
MDAMB231	1,08	17,87	0,0021
MNNG/HOS	0,065	1,285	0,0041
T1P26	1,855	0,17	0,01015
M4Beu	0,34	0,00086	0,02695
M3Dau	0,77	0,04	0,0014
M1Dor	1,46	0,09	0,01205

Tableau R2 : Expression des ARNm de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 dans différents types cellulaires.

Les taux d'ARNm sont exprimés en unités relatives arbitraires (U.R.A). Le taux d'expression des ARNm dans les cellules A549 est le taux de référence (= 1).

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication dont le contenu est détaillé en annexe.

II - 2 - 6 - Détection du ganglion sentinelle

Le ganglion sentinelle est le premier relais de la dissémination métastatique par voie lymphatique. Il s'agit du ganglion lymphatique le plus proche de la tumeur susceptible d'être le siège d'une localisation extra-tumorale immédiate, synonyme de l'imminence d'une dissémination à distance. Sa localisation en vue de l'analyse anatomo-pathologique se trouve être par conséquent fondamentale, particulièrement dans le cas des cancers lymphophiles.

Une première série d'expérimentations chez le rat a permis de mettre à profit les techniques d'imagerie médicale pour localiser le ganglion sentinelle chez l'animal sain. Après anesthésie des animaux, le marqueur radioactif est injecté en intra-dermique au niveau du membre inférieur et du membre supérieur opposé. Les animaux sont placés sous la caméra à scintigraphie. La visualisation des résultats est effectuée une heure plus tard (Figure R36).

Au niveau du membre supérieur, l'image indique la perception d'un point de fixation correspondant au ganglion axillaire.

Au niveau du membre inférieur, l'image permet de détecter la présence du ganglion inguinal matérialisé par une opacité au dessus du point d'injection.

Dans les deux cas, la captation du traceur par le système lymphatique avant son accumulation dans les ganglions sentinelles survient dans les minutes après l'injection du marqueur radioactif.

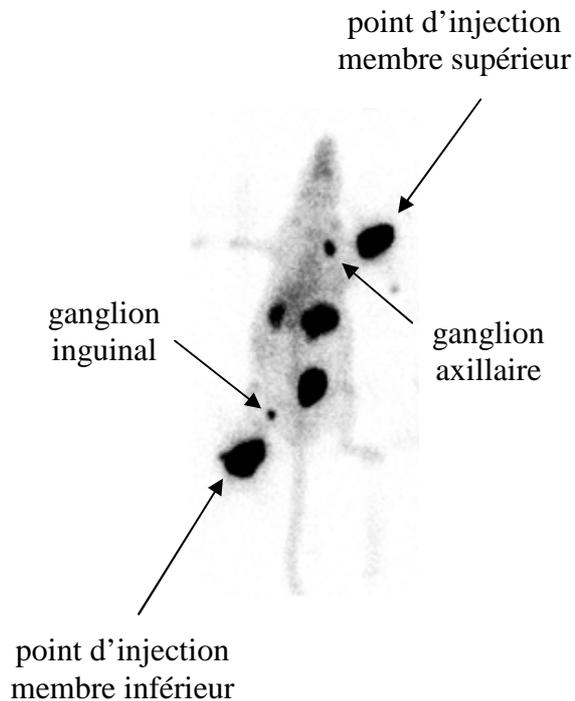


Figure R37 : Détection du ganglion sentinelle par injection de traceur radioactif chez le rat.

L'injection de nanocolloïde radioactif permet la localisation du ganglion sentinelle. Le traceur est injecté en intra-dermique au niveau des membres inférieur gauche et supérieur droit. La prise de vue est réalisée par scintigraphie.

Une seconde série d'examens a été pratiquée chez le rat porteur cette fois d'une tumeur. L'injection du traceur est réalisée dans les mêmes conditions. L'objectif est de déterminer s'il est possible de localiser rapidement et efficacement le ganglion sentinelle chez un sujet atteint d'une tumeur, de manière à réaliser une biopsie de ce ganglion en vue d'un examen anatomo-pathologique. Cet examen est destiné à permettre de diagnostiquer la

présence éventuelle de cellules tumorales dans le ganglion, ce qui correspond à un indice important du degré d'évolution de la maladie.

Le repérage du ganglion sentinelle est réalisé sous caméra à scintigraphie une heure après l'injection du marqueur radioactif (Figure R38 A). Le prélèvement du ganglion est alors effectué, grâce au guidage par une sonde de détection de la source radioactive. La validité du prélèvement est contrôlée par imagerie (Figure R38 B).

Les échantillons sont alors expédiés pour analyse anatomo-pathologique.

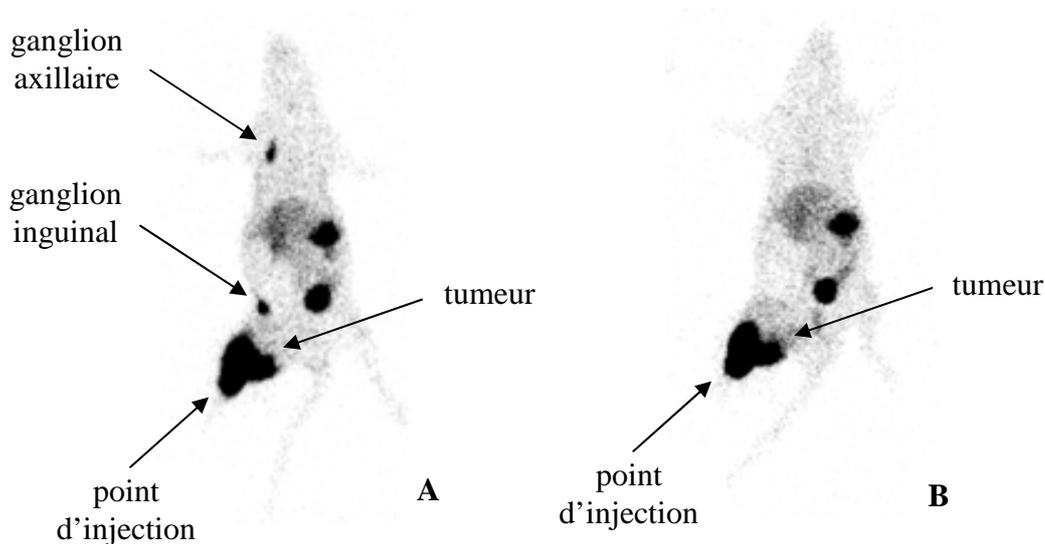


Figure R38 : Localisation puis excision du ganglion sentinelle par marquage radioactif.

Les ganglions axillaire et inguinal localisés par accumulation du traceur nanocolloïdal (A) sont prélevés et soumis à l'analyse histologique. L'exactitude du prélèvement est vérifiée (B) par imagerie en scintigraphie.

III - Discussion et perspectives

Les connaissances actuelles sur les pathologies tumorales incitent à envisager des solutions thérapeutiques multiples et complémentaires pour tenter d'entraver le déroulement de la maladie. Le travail présenté dans cette étude s'inscrit dans le contexte des nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses, dont l'objectif est d'inhiber la progression tumorale en faisant obstacle aux processus physiologiques associés à la biologie des tumeurs. Aussi, nous avons tenté d'initier l'élaboration d'une stratégie permettant d'empêcher le développement orienté de la vascularisation lymphatique péri-tumorale, essentiellement dans le but de réduire la dissémination métastatique dans certains cas de tumeurs solides lymphophiles.

Pour cela, notre travail a consisté en l'élaboration de récepteurs circulants reproduisant en partie les caractéristiques des récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques synthétisés et sécrétés par les cellules tumorales. Ces récepteurs circulants sont destinés à neutraliser les facteurs de croissance avant que ceux-ci n'activent les récepteurs membranaires ordonnant la synthèse des néo-vaisseaux.

Les récepteurs circulants ont été conçus par clonage de la séquence d'intérêt dans un vecteur d'expression à activité sécrétoire, puis exprimés et produits dans des cellules appropriées, avant d'être testés expérimentalement sur des cellules humaines de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques en présence de facteurs de croissance. Il a ainsi été possible d'évaluer l'efficacité inhibitrice des récepteurs circulants sur la croissance et la migration des cellules lymphatiques, ainsi que leur disposition à empêcher la formation des micro-vaisseaux lymphatiques, en réponse au stimulus tumoral.

Les expérimentations menées ont permis de confirmer que :

- les systèmes d'expression conçus et utilisés au cours de ces travaux permettent la synthèse et la sécrétion des récepteurs circulants hVEGFR-3.

- les récepteurs circulants produits ont une conformation qui permet leur interaction avec les facteurs de croissance de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques VEGF-C et VEGF-D. Ils reproduisent par conséquent la caractéristique essentielle recherchée relativement aux récepteurs membranaires.

- les récepteurs circulants exercent une action compétitive vis-à-vis des récepteurs membranaires VEGFR-3.

- l'action des récepteurs circulants sur VEGF-C et VEGF-D est comparable mais pas strictement identique.

- les récepteurs circulants inhibent la croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques médiée par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D.

- les récepteurs circulants sont à l'origine d'un effet s'opposant à la migration orientée des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques d'origine humaine en réponse à une stimulation par les facteurs de croissance considérés dans cette étude.

- les récepteurs circulants perturbent la formation des tubules induite par les facteurs de croissance à l'origine de l'organisation structurelle des néo-vaisseaux lymphatiques.

III - 1 - Les récepteurs circulants inhibent la croissance et le développement des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques humains *in vitro*

III - 1 - 1 - Inhibition de la croissance cellulaire

Une première mise en évidence de l'efficacité des récepteurs circulants élaborés au cours de cette étude a été entreprise en utilisant la technique de culture conjointe des cellules endothéliales lymphatiques humaines et des cellules productrices des récepteurs circulants. Cette approche, permise grâce à l'utilisation de systèmes de cupules comportant une membrane diffusible autorisant le passage des protéines d'intérêt et séparant les deux populations cellulaires, a été réalisée après la vérification expérimentale du caractère activateur des facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D sur les cellules lymphatiques hTERT-HDLEC, dans les conditions définies pour notre étude. Cette activation est comparable dans les deux cas à défaut d'être strictement identique.

L'une des difficultés appréhendée dans l'élaboration de cette stratégie était de parvenir à l'accomplissement de la fixation entre les récepteurs circulants et les facteurs de croissance ciblés. Cette condition constitue en effet la première exigence dans l'optique d'une éventuelle efficacité des récepteurs circulants. La reconstitution des protéines recombinantes sur le modèle des récepteurs membranaires a donc été systématiquement abordée avec l'intention de modifier le moins possible la structure moléculaire des récepteurs circulants par rapport aux récepteurs membranaires. Toute modification de cette structure pouvant être à l'origine de la disparition de la capacité d'interaction récepteur-ligand.

Dans ce contexte, les structures additionnelles ont été proscrites au maximum de la conception des molécules inhibitrices. Cependant, certaines demeurent indispensables pour assurer la fonctionnalité du système. C'est le cas notamment de la séquence IgK-leader dont

la fonction est de permettre la sécrétion des protéines recombinantes au terme de leur synthèse.

Les expérimentations de coculture ont donc été pratiquées dans le but d'établir une première confrontation entre les récepteurs circulants et les récepteurs membranaires relativement à leurs capacités d'établir une liaison avec leur ligand VEGF-C ou VEGF-D.

L'interaction avec les récepteurs circulants a été effectivement constatée dans les deux cas. Elle s'est matérialisée par un ralentissement de la croissance des cellules lymphatiques en culture, exclusivement en présence des récepteurs circulants. De plus, l'inhibition observée était comparable dans le cas du VEGF-C et du VEGF-D. Il semble donc possible de considérer que la structure moléculaire des récepteurs circulants est suffisamment analogue à celle des récepteurs membranaires pour que la liaison entre ces éléments soit possible.

De plus, le terme de ces expérimentations s'est caractérisé par une diminution significative de la croissance des cellules lymphatiques, dans le cas de la présence des récepteurs circulants. L'activation de la voie de transduction du signal lymphangiogénique apparaît par conséquent moindre dans ce cas, ce qui suggère que la dimérisation des monomères de VEGFR-3 membranaire est contrariée. L'action d'une inhibition par compétition des récepteurs circulants semble donc confirmée.

III - 1 - 2 - Inhibition de la migration cellulaire

La capacité de déplacement des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques a été caractérisée au moyen d'un dispositif mis au point pour tenter de reproduire en partie les conditions physiologiques. En l'occurrence, au sein de l'organisme, la mobilité des cellules endothéliales est soumise aux contraintes dues à la pénétrabilité relative des tissus. Cette résistance impose aux cellules des endothéliums certaines dispositions d'invasivité particulièrement mises à contribution au moment du processus lymphangiogénique. Cependant notre modèle basé sur la reconstitution de structures semi-compactes en agarose

implique des différences de réfringence importantes qui limitent considérablement la qualité des prises de vue au moment de l'estimation du processus migratoire, et par conséquent, le traitement et l'analyse des images obtenues.

L'étude de ce paramètre a permis cependant de conclure que les cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques sont sensibles à une stimulation par les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D, et qu'elles y répondent par un déplacement dirigé vers la source trophique. De plus, ces mouvements peuvent être réalisés en dépit d'obstacles mécaniques conséquents. Pendant le processus de la lymphangiogenèse induite par les tumeurs, ces caractéristiques sont vraisemblablement mises à contribution. La tumeur synthétise et secrète des facteurs VEGF-C et VEGF-D qui diffusent au sein des tissus pour parvenir au contact des cellules endothéliales des vaisseaux lymphatiques périphériques. Il en résulte une activation de la transcription des gènes induisant la motilité et la division cellulaire. La formation du bourgeon vasculaire en résultant est par conséquent effectivement orientée en direction de l'origine du signal. Les tumeurs solides possèdent donc la capacité de commander elles-mêmes la mise en place d'un enrichissement vasculaire strictement canalisé au niveau de l'espace péri-tumoral, et destiné à potentialiser leur développement. Cette disposition est retrouvée au cours du processus angiogénique.

Au cours de ces expérimentations, l'exploitation du système d'étude de la migration des cellules endothéliales n'a cependant pas permis de discerner une différence entre les capacités stimulatrices de VEGF-C et de VEGF-D. Cette limite peut être interprétée soit par l'absence effective de différence entre les deux facteurs de croissance, soit par les limites de résolution relatives à notre procédé.

Il est cependant indiscutable de convenir qu'une inhibition par les récepteurs circulants se produit. Elle implique une capacité des récepteurs circulants à empêcher l'action, et par conséquent la liaison, des facteurs de croissance sur les récepteurs membranaires des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques.

III - 1 - 3 - Inhibition de la formation des tubules

La formation des tubules lymphatiques à l'origine de l'organisation de la structure des micro-vaisseaux naissants peut être reconstituée expérimentalement. Elle répond à une activation par les facteurs de croissance sur une matrice appropriée. La mise en place d'un réseau tubulaire semble cependant plus efficace en présence de VEGF-D. La formation des tubules est légèrement pondérée dans le cas d'une induction par le VEGF-C dans les mêmes conditions. Cette observation pourrait correspondre à une spécificité de fixation récepteur-ligand plus importante de VEGF-D par rapport à VEGF-C vis-à-vis du récepteur VEGFR-3 chez l'homme.

De plus, les résultats obtenus permettent de supposer que l'évolution des cellules endothéliales hTERT-HDLEC utilisées au cours de ces expérimentations vers une morphologie tubulaire peut-être partiellement induite par le facteur de croissance VEGF-A. Or, ce facteur de croissance ne constitue pas un ligand habituel du récepteur VEGFR-3. Il a été décrit comme étant susceptible d'avoir une implication relative dans le processus d'activation de la voie de transduction du signal lymphangiogénique, par l'intermédiaire du récepteur VEGFR-2 (Hong *et al.*, 2004).

Cette constatation laisse entrevoir deux autres possibilités. Soit l'induction de la formation des tubules lymphatiques s'opère selon un mécanisme général excluant une spécificité absolue de la relation récepteur-ligand entre les facteurs de croissance et le récepteur VEGFR-3. Soit l'état de différenciation des cellules utilisées pour cette étude, isolées à partir de cellules endothéliales de micro-vaisseaux cutanés, est insuffisant pour éliminer toute potentialité de réponse aux facteurs de croissance impliqués dans le processus angiogénique. Les cellules hTERT-HDLEC pourraient dans ce cas répondre à une stimulation angiogénique par le VEGF-A et orienter leur différenciation vers la formation de micro-vaisseaux de nature hématogène. Les tubules observés ne seraient dans ce cas pas lymphatiques mais sanguins.

Relativement au caractère inhibiteur des récepteurs circulants sur la formation des tubules micro-vasculaires, il est possible de considérer que ces structures protéiques exercent

effectivement une action modératrice. Cette observation est retrouvée d'une manière comparable dans le cas d'une induction par le VEGF-C ou par le VEGF-D. Il apparaît donc d'une part qu'une efficacité de liaison entre ces facteurs de croissance et les récepteurs circulants existe, et d'autre part que cette relation est bien à l'origine d'une compétition avec la liaison entre les facteurs de croissance et le récepteur VEGFR-3 membranaire activateur de la lymphangiogenèse tumorale.

Par ailleurs, on constate également une inhibition de la formation des tubules dans le cas d'une activation par le facteur de croissance VEGF-A, évoquant entre autre l'hypothèse d'une interaction possible entre les récepteurs circulants et ce facteur de croissance angiogénique. Cette éventualité ouvre la perspective d'un caractère inhibiteur des récepteurs circulants sur certaines étapes du processus angiogénique. En effet, la structure des domaines extra-cellulaires des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 responsables de la transduction du signal angiogénique, et celle du récepteur VEGFR-3, responsable de l'activation lymphangiogénique sont relativement proches (Aprelikova *et al.*, 1992) et n'exclue pas la possibilité que les récepteurs circulants puissent se fixer sur leurs ligands respectifs. Cette éventualité élargirait le champ d'action des récepteurs circulants à une inhibition partielle de certaines étapes du processus angiogénique. Des vérifications expérimentales sont envisagées pour étudier ces perspectives.

III - 2 - L'environnement physiologique peut-il s'opposer à l'efficacité des récepteurs circulants *in vivo* ?

Les conditions expérimentales dans lesquelles l'action compétitive et inhibitrice des récepteurs circulants hVEGFR-3 a été mise en évidence correspondent à des circonstances idéales qui ne reproduisent que très partiellement la réalité physiologique. De multiples paramètres sont à prendre en considération pour estimer l'hypothèse d'une action comparable *in vivo*.

En effet, les modèles expérimentaux sont reconstitués à partir des seuls paramètres de l'analyse spécifique des molécules impliquées dans le processus étudié. Ils excluent les interactions, inactivations physiologiques et autres ligations non spécifiques qui réduisent ou annulent parfois l'activité de la molécule thérapeutique.

III - 2 - 1 - Efficacité des récepteurs circulants et interactions pharmacologiques

De nombreux facteurs de la variabilité de l'efficacité des molécules thérapeutiques existent. L'absorption du médicament, c'est-à-dire le processus par lequel celui-ci passe de son site d'administration à la circulation générale, puis son transport et sa distribution locale sont des étapes au cours desquelles il est possible de déplorer des modifications importantes de son efficacité thérapeutique.

Dans la circulation générale, les récepteurs circulants peuvent se lier aux protéines plasmatiques, présentes en grande quantité, et s'associer à ces structures pour former des complexes. La liaison en résultant est généralement réversible mais seule la forme libre des récepteurs solubles est active. Les protéines plasmatiques impliquées dans ce type d'inactivation sont l'albumine, les gammaglobulines, les lipoprotéines, l'acide alpha 1 glycoprotéine et les cellules sanguines (lymphocytes, plaquettes, polynucléaires, érythrocytes) principalement.

Par la suite, la diffusion des molécules thérapeutiques impose le franchissement des membranes tissulaires. Dans certains tissus, la paroi vasculaire est composée de membranes discontinues permettant une diffusion relativement aisée du médicament. A l'opposé à proximité d'autres organes, la paroi vasculaire est composée de capillaires continus difficilement franchissables. Le phénomène de diffusion tissulaire proprement dit, c'est-à-dire la fixation des récepteurs circulants aux membranes tissulaires, peut avoir des conséquences considérables sur la distribution des molécules. Si les caractéristiques physico-chimiques des récepteurs circulants sont telles que la fixation aux membranes tissulaires est importante, les concentrations totales circulantes peuvent décroître fortement.

Il n'est pas possible d'exclure totalement le risque d'une bio-transformation des récepteurs circulants, particulièrement par le fait des enzymes des microsomes. Les modifications moléculaires au niveau hépatique sont en effet à considérer avec application dans le cas du choix d'une administration par voie sanguine. Les hépatocytes contiennent en effet un nombre considérable d'enzymes impliquées dans la transformation des molécules thérapeutiques. Elles catalysent en particulier des réactions d'oxydoréduction, des hydroxylations ou encore la rupture oxydative des liaisons N-C et O-C. L'élément fondamental de ce système enzymatique est le cytochrome P450 comprenant de nombreuses isoenzymes. Par ailleurs, la conjugaison avec l'acide glucuronique est fréquente. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne toutes les molécules qui possèdent un groupement hydroxyle, carboxyle ou amine.

III - 2 - 2 - Récepteurs circulants et réponse immunitaire

L'introduction dans l'organisme de protéines étrangères ou modifiées déclenche l'activation des mécanismes de défense du système immunitaire. Il en résulte la survenue d'une réaction inflammatoire et d'une inactivation protéolytique des molécules exogènes. Dans le contexte particulier de la mise en application d'un traitement, le déclenchement d'une réaction inflammatoire constitue un effet secondaire considérable.

Les récepteurs circulants doivent par conséquent être administrés sous une forme excluant l'hypothèse d'une telle éventualité. L'encapsulation dans une structure lipidique ou neutre pourrait dans ce cas masquer le caractère immunogène des molécules injectées.

Aux vues de ces conditions, il apparaît que la résolution des principaux écueils pouvant s'opposer à l'efficacité des récepteurs circulants est donc particulièrement liée au choix de leur mode d'administration. L'efficacité de ces molécules impose que la cible thérapeutique, en l'occurrence le stroma péri-tumoral et la tumeur, soit atteinte. Une administration systémique ne semble donc envisageable que dans l'éventualité où un vecteur permette l'acheminement des molécules spécifiquement à proximité immédiate de la tumeur.

En effet, dans le cas d'une administration systémique conventionnelle, il est à prévoir une diffusion des récepteurs circulants dans tout l'organisme, avec pour conséquence une inefficacité probable en rapport avec une dose insuffisante au niveau tumoral, voire une perturbation des sites de synthèses vasculaires lymphatiques non pathologiques. Une administration locale semblerait donc correspondre à une éventualité plus réaliste.

III - 3 - Quelle est la meilleure voie d'administration des récepteurs circulants pour une indication anti-tumorale ?

Si l'administration des traitements basés sur les récepteurs circulants, pratiquée classiquement par injection sous-cutanée, intra-veineuse ou intra-musculaire permet l'acheminement des molécules thérapeutiques au niveau tissulaire, elle ne garantit en aucune manière la spécificité de ciblage indispensable des récepteurs solubles dans le cas de l'inhibition de la vascularisation lymphatique ou sanguine à la périphérie immédiate des tumeurs solides.

Les molécules sont dans ce cas acheminées via le flux vasculaire sanguin et distribuées d'une manière générale et équivalente aux différents tissus et organes. Outre l'absence de spécificité de ciblage thérapeutique, une administration des récepteurs circulants par injection systémique serait susceptible d'entraîner une réduction considérable de la demi-vie plasmatique des protéines recombinantes, et de les soumettre aux dégradations enzymatiques du tractus liquidien.

L'utilisation de liposomes semble correspondre à une résolution efficace de ces principaux écueils. Il s'agit de vésicules de l'ordre d'un micromètre dont la membrane est formée par une double couche de phospholipides amphiphiles. Ils sont de plus en plus employés pour améliorer l'administration d'acides nucléiques vers des cibles organiques ou tissulaires. Ces vésicules peuvent véhiculer des agents lipophiles solubilisés à l'intérieur de la membrane ou hydrophiles à l'intérieur de la capsule.

Il a été mis en évidence que l'application de cette technique peut aboutir à un ciblage de qualité dans la bio-distribution des capsules lipidiques au niveau des néo-vaisseaux péri-tumoraux, et permettre d'obtenir une accumulation des liposomes jusqu'à 3 fois supérieure dans la région immédiatement au contact du tissu tumoral par rapport aux tissus musculaires environnants (Thurston *et al.*, 1998 ; Krasnici *et al.*, 2003). Cette circonstance est obtenue en utilisant des liposomes cationiques, par conséquent chargés positivement, qui possèdent une affinité pour les néo-vaisseaux, porteurs de charges électriques faiblement négatives. L'attraction électrostatique, bien que faible, est suffisante pour être à l'origine du ciblage des liposomes cationiques vis-à-vis des néo-vaisseaux péri-tumoraux.

Outre le ciblage des néo-vaisseaux, les liposomes cationiques, qui constituent des capsules lipidiques, assurent une protection efficace de l'élément transporté jusqu'au site d'intérêt. Ils assurent ainsi le maintien de la structure de la molécule encapsidée.

La libération des molécules transportées par les vésicules se fait par rupture de la double couche phospholipidique au moment où les liposomes porteurs de charges positives entrent en contact avec les cellules endothéliales des néo-vaisseaux, présentant sur leur surface externe des charges négatives. Cette distribution ciblée est facilitée par le biomimétisme induit aux récepteurs cationiques dont la structure membranaire est comparable à celle des membranes biologiques.

L'optimisation de ces vecteurs lipidiques reste cependant d'actualité et impose en particulier des améliorations quant à leur efficacité de transfection. Leur utilisation thérapeutique implique également une stabilité accrue, et une toxicité moindre. Ces perfectionnements sont susceptibles de concerner la nature du lipide cationique, la nature du colipide, le rapport lipide cationique/colipide, ainsi que le rapport des charges.

L'administration ciblée des récepteurs circulants hVEGFR-3 par voie systémique demeure cependant une solution intéressante permettant d'envisager une limitation d'un risque éventuel de diffusion des récepteurs solubles dans tout l'organisme, épargnant ainsi les perturbations qui pourraient en découler sur le déroulement normal des synthèses vasculaires.

Cependant, l'utilisation de cette technique n'est pas décrite quant à la vésiculation de protéines. La nature des liposomes permet généralement l'encapsulation des acides nucléiques. Le vecteur d'expression recombinant conçu pour permettre la synthèse des récepteurs circulants réalisés au cours de nos travaux a été modélisé dans la considération de cette hypothèse. Sa construction a été basée sur la mise en place d'une séquence de sécrétion et l'utilisation d'un promoteur fort pour induire une expression importante de la protéine *in situ*, utilisant la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle des cellules cibles.

L'administration des récepteurs circulants sous leur forme protéique peut cependant être réalisée, à la condition de s'assurer que celle-ci soit effectuée par injection locale au niveau du stroma péri-tumoral. En effet, cette disposition correspond à une solution destinée d'une part à éviter le risque de dégradation par les enzymes protéolytiques, et d'autre part à assurer un ciblage thérapeutique de meilleure qualité. De plus, les récepteurs circulants ont été élaborés sans qu'on leur adjoigne de séquence de stabilisation de type Fc-IgG1, parfois utilisée pour améliorer la demi-vie plasmatique des molécules (Maruyama *et al.*, 2004). Ce choix est la résultante d'une intention de modifier au minimum la séquence protéique reconstruite par rapport à la séquence originelle, de manière à reproduire le plus fidèlement possible la structure de la protéine naturelle et donc, ses caractéristiques biologiques. La voie d'administration par injection locale au niveau du stroma péri-tumoral semble cependant rejeter la possibilité d'une utilisation des récepteurs circulants pour le cas des tumeurs profondes.

Que ce soit dans le cas d'une administration des vecteurs recombinants dans des liposomes cationiques ou dans le cas de l'injection *in situ* des récepteurs circulants, la dose permettant l'efficacité et excluant la toxicité reste à définir. Cette démarche constitue la prochaine étape dans la mise au point de l'utilisation de ces molécules chez l'animal. Il s'agit d'une finalisation délicate puisque des concentrations circulantes proches sont susceptibles d'être à l'origine d'une réponse pharmacodynamique extrêmement variable, allant de l'inefficacité à la toxicité sévère. Des gammes d'essai de traitement seront par conséquent nécessaires pour affiner la dose optimale.

L'expression de VEGFR-3, VEGF-C et VEGF-D peut-elle influencer la croissance tumorale et le potentiel métastatique ?

Les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D ont une importance considérable dans le processus lymphangiogénique. Ces facteurs sont synthétisés par les tumeurs, ce qui favorise la vascularisation lymphatique péri-tumorale et par conséquent la dissémination métastatique. En effet, la fixation de ces facteurs de croissance sur le récepteur VEGFR-3 exprimé à la surface des cellules de l'endothélium des vaisseaux conduit à la progression de ces cellules en direction de la tumeur.

La codance du gène VEGFR-3 est très forte dans la plupart des cellules de l'organisme au moment de la vasculogenèse embryonnaire, avant de se restreindre quasiment aux seuls vaisseaux lymphatiques. Toutefois, cette expression a été mise en évidence dans quelques autres tissus chez l'adulte.

La surexpression de VEGFR-3, VEGF-C et VEGF-D est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux types tumoraux. De plus, la co-expression de VEGFR-3 et VEGF-C ou VEGF-D détectée dans plusieurs types tumoraux suggère que les facteurs de croissance puissent directement influencer la croissance tumorale selon un mécanisme de régulation autocrine.

Nous avons mesuré le taux d'expression de l'ARNm de VEGFR-3 dans 16 types cellulaires tumoraux et un type de cellules non tumorales chez l'Homme, et nous l'avons comparé avec l'expression de VEGF-C et VEGF-D.

Nos résultats montrent que, contrairement à VEGF-D, les ARNm de VEGFR-3 et VEGF-C ne sont pas détectés dans tous ces types cellulaires, et que leurs niveaux d'expression sont parfois très différents. De plus, nous avons observé que dans un même type cellulaire, le taux d'ARNm de VEGFR-3 et VEGF-D est corrélé négativement, et cela de manière significative.

Nous avons utilisé la technique de RT-PCR quantitative pour déterminer le niveau d'expression de VEGFR-3, VEGF-C et VEGF-D normalisé par le gène de référence G6PDH. Il s'agit en effet d'une méthode extrêmement fiable pour apprécier la codance des gènes.

L'expression de VEGFR-3 n'a pas été détectée dans les cellules tumorales T24 (vessie), SHSY5Y (neuroblastome) et les lignées de tumeurs colorectales. Si cette expression n'est pas trouvée dans la lignée SHSY5Y, elle est cependant très forte dans sa lignée parentale SK-N-DZ, dérivée de métastases osseuses de neuroblastome (Beierle *et al.*, 2004). Dans la mesure où SHSY5Y est un sous-clone éloigné (3 générations) de SK-N-DZ, ce résultat suggère que le phénotype parental a été modifié par les conditions de la culture cellulaire jusqu'à la perte de l'expression du gène VEGFR-3, devenu inutile dans un environnement non tumoral.

Dans un second groupe de lignées cellulaires, incluant les cellules de mélanome, d'ostéosarcome (MNNG/HOS) et de cancer du sein (MDA-MB-231), l'expression de VEGFR-3 a été détectée de manière excessivement discrète. Par ailleurs, une étude récente n'évoque pas la trace de l'expression de VEGFR-3 dans les cellules MDA-MB-231 (Fitzpatrick *et al.*, 2003). Cette nuance peut être interprétée par une sensibilité moindre de la technique utilisée alors. D'autres investigations sont à envisager dans le but de déterminer si l'expression de VEGFR-3 dans ces types tumoraux peut être considérée comme négligeable, ou si cette expression résiduelle est susceptible de déclencher un mécanisme autocrine de croissance tumorale.

Une expression importante du gène VEGFR-3 a été mesurée dans cinq types cellulaires : les cellules de leucémie (HEL), de cancer pulmonaire non à petites cellules (A549), les lymphocytes T, les cellules Molt4 et Jurkat. En 1992, Aprelikova a décrit une expression de l'ARNm de VEGFR-3 dans les cellules HEL, mais pas dans les cellules Molt4 (Aprelikova *et al.*, 1992). Cette expression n'a par ailleurs jamais été décrite dans les cellules Jurkat ni dans les lymphocytes T. Les événements physiologiques et moléculaires relatifs à cette expression demeurent cependant mal compris : ces cellules pourraient dériver d'une lignée lymphoblastique embryonnaire commune et avoir conservé une expression résiduelle de VEGFR-3. L'expression du récepteur pourrait correspondre à une régulation autocrine permettant d'assurer la migration et la survie cellulaire (Fielder *et al.*, 1997). Ainsi,

l'expression de VEGFR-3 pourrait être associée à la manifestation de dispositions migratoires des cellules (Chou *et al.*, 2003).

La surexpression de VEGF-C et de VEGF-D est généralement associée avec un mauvais pronostic de la pathologie tumorale. Une corrélation entre la co-expression de VEGFR-3 et VEGF-C ou VEGF-D a été décrite dans de nombreux cas de tumeurs, comme les tumeurs colorectales (Kawakami *et al.*, 2003 ; Witte *et al.*, 2002), les neuroblastomes (Meister *et al.*, 1999 ; Eggert *et al.*, 2000), les cancers du sein (Nakamura *et al.*, 2003 ; Valtola *et al.*, 1999) et les leucémies (Dias *et al.*, 2002).

Nous avons mis en évidence que l'ARNm de VEGF-C, contrairement à celui de VEGF-D, n'est pas détecté dans tous les types cellulaires que nous avons étudié. Les plus forts taux ont été trouvés dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231. Ce résultat est confirmé par des travaux antérieurs (Fitzpatrick *et al.*, 2003 ; Al-Rawi *et al.*, 2005). Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549, de cancer de la vessie T24 et d'ostéosarcome 1547 ont également des niveaux d'expression de l'ARNm de VEGF-C relativement élevés. Au contraire, cette expression n'a pas été trouvée dans les cellules Molt4 et Jurkat, dans les cellules d'adénocarcinome pulmonaire Widr, ainsi que dans leur lignée parentale HT-29 cl19A. Par ailleurs, les lignées d'adénocarcinome colorectal, qui expriment peu ou pas l'ARNm de VEGF-C, expriment en revanche fortement VEGF-D. C'est particulièrement le cas de la lignée SW480.

Nous pouvons par conséquent émettre l'hypothèse qu'une telle surexpression de l'ARNm de VEGF-D peut être mise en corrélation avec le fort potentiel métastatique de ces tumeurs, dans la mesure où la lignée SW620 a été isolée à partir de ganglions lymphatiques envahis, chez le même patient un an plus tard.

Dans cette série expérimentale, il a donc été possible d'établir une corrélation négative entre l'expression de VEGFR-3 et du facteur de croissance VEGF-D dans un même type cellulaire.

De plus, l'expression du récepteur VEGFR-3 dans de nombreux types tumoraux permet de suggérer l'hypothèse d'une implication de cette protéine dans les capacités de

migration de types cellulaires autres que les cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques. Par ailleurs, l'étude de l'existence d'une corrélation entre l'expression de VEGFR-3 et le pronostic de la maladie est à envisager.

Enfin, la co-expression de VEGFR-3 et de VEGF-C ou VEGF-D dans certaines lignées d'une part, et la corrélation négative entre VEGFR-3 et VEGF-D d'autre part, conduit à penser que des régulations paracrine et autocrine sont susceptibles d'être à l'origine de la modulation de la croissance tumorale et de la dissémination métastatique en fonction du type tumoral.

III - 5 - L'imagerie médicale peut-elle constituer un outil efficace d'évaluation d'un traitement anti-lymphangiogénique ?

Les techniques d'imagerie médicales actuelles ne sont pas particulièrement performantes dans le cadre de l'observation du réseau vasculaire lymphatique. Or, l'estimation finale de l'efficacité des récepteurs circulants considérés dans cette étude passe obligatoirement par une visualisation permettant une quantification de la densité vasculaire lymphatique péri-tumorale. Une étude du réseau vasculaire avec ou sans le traitement sur des animaux par les récepteurs solubles VEGFR-3 constitue par conséquent un outil indispensable à la détermination de l'efficacité de ces derniers.

Actuellement, la lymphoscintigraphie est la seule technique répondant partiellement à cette obligation. L'utilisation d'un colloïde métallique radioactif approprié pouvant permettre de rendre compte de l'évolution du réseau lymphatique péri-tumoral a été mise en application dans ce travail. En effet, la paroi des capillaires lymphatiques est dépourvue de membrane basale et présente des interruptions de continuité. La solution est administrée dans l'espace interstitiel du territoire à étudier et les particules colloïdales marquées pénètrent rapidement par ces béances pour rejoindre la circulation lymphatique.

Les expériences d'accumulation des particules nanocolloïdales marquées au niveau des filtres ganglionnaires nous ont permis de localiser les ganglions sentinelles. Il s'agit du premier ganglion concerné par un éventuel envahissement métastatique issu de la tumeur primitive. L'étude histologique après biopsie de ce ganglion est donc théoriquement prédictive de celle de l'intégralité de la chaîne ganglionnaire. En outre, l'invasion du ganglion sentinelle est synonyme de l'initiation d'une dissémination métastatique par la voie lymphatique. L'étude comparative par lymphographie de ces ganglions peut donc constituer une base pour l'analyse de l'efficacité de l'administration de récepteurs circulants sur la dissémination métastatique par voie lymphatique, en considérant qu'il existe une corrélation entre la dissémination métastatique par voie lymphatique et la densité vasculaire lymphatique péri-tumorale.

Cependant, l'estimation par cette technique de l'influence du traitement sur l'évolution du réseau lymphatique péri-tumoral est indirecte. Elle ne permet pas la visualisation des néo-vaisseaux mais l'analyse des conséquences de ces évolutions sur la dissémination métastatique. En effet, il est simplement possible grâce à cette méthode de localiser puis de prélever les ganglions sentinelles afin de déterminer s'ils constituent ou pas un site métastatique. La comparaison de séries expérimentales d'animaux traités ou non traités par récepteurs circulants VEGFR-3 est donc destinée à donner une indication de l'effet du traitement sur la dissémination métastatique. La méthode d'analyse n'est pas directe mais l'information recherchée est atteinte.

Une autre approche d'évaluation expérimentale chez l'animal de l'efficacité des récepteurs circulants peut consister à réaliser des coupes histologiques des tissus péri-tumoraux. La détection de la densité vasculaire grâce à l'utilisation de marqueurs de la lymphangiogenèse tels LYVE-1, la podoplanine, Prox-1 ou encore VEGFR-3 est envisageable. L'utilisation de marquages croisés avec recours à plusieurs de ces anticorps au moment de l'analyse comparative chez des animaux traités et non traités est cependant nécessaire étant donné la spécificité relative de ces molécules.

III - 4 - La lymphangiogenèse tumorale est-elle susceptible de contourner une stratégie anti-VEGFR-3 ?

Les récepteurs solubles utilisés dans notre étude ont été conçus de manière à exercer une activité compétitive et inhibitrice vis-à-vis des récepteurs membranaires VEGFR-3, dans le but d'entraver le déroulement du processus lymphangiogénique au moment de l'évolution tumorale.

En effet, les récepteurs VEGFR-3 sont décrits comme étant spécifiquement responsables de l'activation de la signalisation lymphangiogénique. Le blocage de la voie d'activation de ce récepteur membranaire suggère par conséquent une efficacité sur la physiologie des vaisseaux lymphatiques naissants.

Cependant, en matière de pathologie humaine, il n'est pas exceptionnel de déplorer le contournement de la voie thérapeutique établie. Dans notre cas, une surexpression des facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D par la tumeur ne peut être exclue totalement. En effet, la carence vasculaire lymphatique est susceptible d'être à l'origine de modifications considérables au niveau du stroma péri-tumoral. L'accumulation des déchets du métabolisme prolifératif des cellules cancéreuses et le défaut d'irrigation tissulaire peuvent être perçus par les cellules tumorales comme les signes d'un stress à l'origine de l'activation de la transcription des gènes susceptibles de permettre une adaptation à cette carence. La seule alternative à cette éventualité serait alors l'utilisation de doses thérapeutiques plus élevées.

Par ailleurs, de récents travaux de recherche suggèrent qu'une activation de la lymphangiogenèse est susceptible de survenir en réponse à une signalisation par les récepteurs VEGFR-2. L'activation serait dans ce cas le fait du facteur de croissance VEGF-A. Cette hypothèse ouvre l'éventualité qu'en cas d'une inhibition de la lymphangiogenèse induite au niveau des récepteurs VEGFR-3, la signalisation se trouve médiée par les récepteurs membranaires VEGFR-2 pour contourner le blocage (Hong *et al.*, 2004).

La solution à cette éventualité consisterait à ce que les récepteurs circulants possèdent la capacité de se lier non seulement aux facteurs VEGF-C et VEGF-D, mais également au facteur VEGF-A, avec une spécificité comparable.

La structure du facteur de croissance VEGF-A se trouve être relativement analogue à celle des facteurs VEGF-C et VEGF-D (Shibuya, 2001). Il existe d'ailleurs un certain nombre d'homologies entre les facteurs de croissance VEGF entre eux d'une part, et les récepteurs VEGFR à ces facteurs entre eux d'autre part. Ces dernières expliquent d'ailleurs en partie les compatibilités croisées observées entre les différents facteurs de croissance et leurs récepteurs. Ces homologies sont trouvées particulièrement au niveau de la région extracellulaire de la protéine, qui se trouve être la zone d'interaction récepteur-ligand. Il n'est cependant pas établi de manière catégorique que cette spécificité relative entre les récepteurs VEGFR et les différents VEGF soit suffisante pour considérer qu'un blocage du VEGF-A par les récepteurs circulants synthétisés pour se fixer aux VEGF-C et VEGF-D soit objectivement envisageable.

Toutefois, au cours de nos expérimentations, nous avons mis en évidence une certaine forme de potentialité inhibitrice des récepteurs circulants vis-à-vis de la stimulation de la formation des tubules vasculaires par VEGF-A. Des expérimentations supplémentaires d'inhibition de la croissance cellulaire et d'inhibition de la formation des microtubules vasculaires sont à envisager pour argumenter ce résultat.

III - 6 - L'angiogenèse tumorale peut-elle est stimulée en cas d'inhibition de la lymphangiogenèse ?

Le contournement d'une hypothétique inhibition de l'enrichissement vasculaire lymphatique par les tumeurs pourrait cependant prendre un autre aspect.

Il existe deux voies vasculaires assurant aux tumeurs un approvisionnement nécessaire à leur développement. Ces deux voies sont la voie sanguine et la voie lymphatique. Les corrélations entre ces deux systèmes sont multiples. Il n'est pas possible d'exclure absolument l'hypothèse qu'une inhibition de l'une de ces voies ne provoque indirectement la stimulation de l'autre dans le but de compenser au mieux l'insuffisance vasculaire générée. Certes les fonctions et caractéristiques physiologiques des deux systèmes sont singulières mais on sait aujourd'hui que l'activation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse se trouve sous la direction de molécules remarquablement comparables et génétiquement apparentées.

Par conséquent, la question des répercussions possibles de l'efficacité d'une stratégie anti-lymphangiogénique se pose. Peut-on éliminer totalement l'hypothèse qu'une activation de l'angiogenèse ne puisse constituer une réponse adaptative de la tumeur à l'inhibition de la lymphangiogenèse d'une part et d'autre part que cette conséquence ne puisse être plus déplorable encore que la situation initiale.

Cette hypothèse semble devoir impérativement être vérifiée expérimentalement chez l'animal. Pour cela, nous pouvons envisager l'utilisation de la technique d'imagerie par angioscintigraphie au ^{99m}Tc , qui semble être l'une des méthodes les plus résolutive pour le suivi de l'évolution angiogénique. Cette technique permet en effet d'étudier la vascularisation sanguine d'un tissu indirectement après le marquage des globules rouges.

Si l'on prend en considération ce paramètre, et si cette hypothèse se vérifie expérimentalement, il devient difficile de considérer la solution anti-lymphangiogénique comme étant dissociable d'une stratégie anti-angiogénique.

III - 7 - Perspectives : couplage des stratégies anti-lymphangiogénique et anti-angiogénique

Les réseaux vasculaires lymphatique et sanguin sont intimement associés quant à leur implication dans le fonctionnement normal de l'organisme. Leurs fonctions sont complémentaires et leurs évolutions, depuis l'embryogenèse jusqu'aux réponses adaptatives aux contraintes physiologiques, sont étroitement liées.

Au cours du processus tumoral, ces deux systèmes sont en quelque sorte détournés de leurs fonctions initiales par les tumeurs solides dans le but de potentialiser leur développement et d'assurer la dissémination à distance de cellules cancéreuses vers des localisations secondaires.

Par ailleurs, l'induction et la régulation de la lymphangiogenèse et de l'angiogenèse tumorales sont sous la dépendance de mécanismes extrêmement comparables, faisant intervenir des molécules proches et parfois même interactives.

La stratégie anti-vasculaire de lutte contre les cancers constitue un concept récent, destiné à asphyxier, sevrer et isoler la tumeur de manière à entraver son évolution. La combinaison des approches anti-angiogénique et anti-lymphangiogénique évoque l'hypothèse d'une prise en considération globale, et par conséquent probablement complète, des tentatives de résolution de la maladie par la voie vasculaire.

Du reste, il existe de plus en plus de doutes sur la spécificité jusqu'alors supposée des mécanismes de régulation de ces deux processus. La singularité des interactions entre les facteurs de croissance des cellules des endothéliums vasculaires et leurs récepteurs sont en particulier mises en cause depuis la découverte de l'implication potentielle du récepteur VEGFR-2 activé par le facteur de croissance VEGF-A dans l'induction de la lymphangiogenèse.

De plus, quelques incertitudes demeurent quant aux conséquences d'une inhibition partielle de l'une de ces deux voies. En particulier, l'inertie absolue de l'angiogenèse tumorale en cas d'inhibition de la lymphangiogenèse n'a jamais été mise en évidence.

Par conséquent, il semble que la solution la plus appropriée pour exclure ce risque soit un couplage entre les deux stratégies anti-vasculaires. Ce couplage semble ne pouvoir être en outre à l'origine que d'une potentialisation de l'efficacité de chacune de ces approches, à la seule condition que le ciblage des traitements soit suffisamment spécifique.

Par ailleurs, une adaptation des schémas thérapeutiques actuels visant à optimiser l'association entre les effets antiprolifératifs des thérapies classiques et l'action inhibitrice des stratégies ant-vasculaires pourrait se traduire par une efficacité thérapeutique optimisée.

IV - Conclusion

La lymphangiogenèse tumorale est un processus physiologique en grande partie mis en place par les cellules cancéreuses pour améliorer leur développement et favoriser leur croissance. Elle améliore en particulier la détoxification de l'environnement des cellules prolifératives, complète l'irrigation tissulaire de la tumeur et potentialise la dissémination des cellules métastatiques. La lymphangiogenèse induite par les cellules tumorales résulte de la synthèse puis de la libération de facteurs de croissance des vaisseaux lymphatiques, essentiellement VEGF-C et VEGF-D, qui interagissent avec des récepteurs localisés sur les cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, nommés VEGFR-3. Il résulte de cette interaction l'activation de la voie de transduction du signal lymphangiogénique qui aboutit à la stimulation de l'expression des gènes responsable de la division des cellules endothéliales. La croissance des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques en réponse au stimulus adressé par les cellules tumorales est dirigée vers l'origine de ce signal et il en résulte la formation de néo-vaisseaux lymphatiques dans le stroma péri-tumoral.

L'objectif de notre travail a consisté à perturber ce mécanisme au moyen de récepteurs circulants reproduisant le site de fixation entre les facteurs de croissance VEGF-C et VEGF-D d'une part et les récepteurs membranaires VEGFR-3 d'autre part. Ces récepteurs solubles sont modélisés pour se fixer sur les facteurs de croissance et établir ainsi une compétition avec les récepteurs localisés sur la membrane des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, activateurs du signal lymphangiogénique. Ce blocage est destiné à limiter la prolifération vasculaire lymphatique péri-tumorale.

Au terme des étapes de conception des récepteurs circulants par les techniques actuelles de la biologie moléculaire, les caractéristiques inhibitrices des protéines modifiées ont été évaluées relativement à leur capacité à entraver la croissance dirigée des cellules de l'endothélium des vaisseaux lymphatiques, en réponse aux facteurs de croissance tumoraux.

Dans les conditions expérimentales considérées, les récepteurs solubles ont été à l'origine d'une inhibition de la croissance des cellules endothéliales lymphatiques humaines, d'une réduction de la migration de ces cellules en direction du stimulus tumoral, et d'une modération de la formation des tubules lymphatiques à l'origine des micro-vaisseaux.

Ces résultats suggèrent une potentialité des récepteurs solubles VEGFR-3 à contribuer à l'appauvrissement du réseau vasculaire lymphatique péri-tumoral, dont les modalités seront précisées au cours des expérimentations *in vivo* manquant à l'accréditation de nos applications.

Les stratégies de lutte contre la progression tumorale reposant sur l'inhibition de l'angiogenèse induite par les cellules cancéreuses font partie des solutions thérapeutiques susceptibles de devenir prochainement significativement efficaces. Cette orientation anti-angiogénique très prometteuse est cependant généralement dissociée d'éventuelles démarches anti-lymphangiogéniques, alors qu'une combinaison de ces méthodes semblerait pouvoir constituer une base substantielle pour la finalisation de stratégies vasculaires plus complètes de lutte contre la plupart des tumeurs solides et pouvant être, en outre, utilisée en temps qu'outil thérapeutique additionnel aux traitements classiques actuels.

Bibliographie

A

Abramova NA, Russell J, Botchan M, Li R. **Interaction between replication protein A and p53 is disrupted after UV damage in a DNA repair-dependent manner.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 July; 94 : 7186-91

Ahmad A, Hart IR. **Mechanisms of metastasis.** *Crit Rev Oncol Hematol*. 1997 Dec; 26 (3): 163-73.

Akiyama H, Yamaoka H, Tanaka K, Ishikawa T, Ichikawa Y, Wakasugi J, Nagashima Y, Shimada H. **Continuous hyperthermic peritoneal perfusion for peritoneal dissemination of gastric cancer.** *Hepatogastroenterology*. 1998 Nov-Dec; 45 (24): 2079-86

Akutagawa N, Nishikawa A, Iwasaki M, Fujimoto T, Teramoto M, Kitajima Y, Endo T, Shibuya M, Kudo R. **Expression of vascular endothelial growth factor and E-cadherin in human ovarian cancer: association with ascites fluid accumulation and peritoneal dissemination in mouse ascites model.** *Jpn J Cancer Res*. 2002 Jun; 93 (6): 644-51

Al-Rawi MA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. **Interleukin 7 upregulates vascular endothelial growth factor D in breast cancer cells and induces lymphangiogenesis in vivo.** *Br J Surg*. 2005 Mar; 92 (3): 305-10

Andreassen A, Oyjord T, Hovig E, Holm R, Florenes VA, Nesland JM, Myklebost O, Hoie J, Bruland OS, Borresen AL. **p53 abnormalities in different subtypes of human sarcomas.** *Cancer Res*. 1993 Feb 1; 53 (3): 468-71

Aprelikova O, Pajusola K, Partanen J, Armstrong E, Alitalo R, Bailey SK, McMahon J, Wasmuth J, Huebner K, Alitalo K. **FLT-4, a novel class III receptor tyrosine kinase in chromosome 5q33-qter.** *Cancer Res.* 1992 Feb 1; 52 (3): 746-8

Arai K, Masutomi K, Khurts S, Kaneko S, Kobayashi K, Murakami S. **Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity.** *J Biol Chem.* 2002 Mar 8; 277 (10): 8538-44

August DA, Sugarbaker PH, Schneider PD. **Lymphatic dissemination of hepatic metastases. Implications for the follow-up and treatment of patients with colorectal cancer.** *Cancer.* 1985 Apr 1; 55 (7): 1490-4

B

Bachelot T, Jouanneau E, Blay JY. **Clinical development of anti-angiogenic agents in 2002.** *Bull Cancer.* 2003 Jan; 90 (1): 19-23

Bali A, O'Brien PM, Edwards LS, Sutherland RL, Hacker NF, Henshall SM. **Cyclin D1, p53, and p21Waf1/Cip1 expression is predictive of poor clinical outcome in serous epithelial ovarian cancer.** *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 1; 10 (15): 5168-77

Banerji S, Ni J, Wang SX, Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. **LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan.** *J Cell Biol.* 1999 Feb 22; 144 (4): 789-801

Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, Genovese MC, Wasko MC, Moreland LW, Weaver AL, Markenson J, Finck BK. **A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis.** *N Engl J Med.* 2000 Nov 30; 343 (22): 1586-93

Beck C, Cayeux S, Lupton SD, Dorken B, Blankenstein T. **The thymidine kinase/ganciclovir-mediated "suicide" effect is variable in different tumor cells.** *Hum Gene Ther.* 1995 Dec; 6 (12): 1525-30

Beierle EA, Dai W, Langham MR Jr, Copeland EM 3rd, Chen MK. **Expression of VEGF receptors in cocultured neuroblastoma cells.** *J Surg Res.* 2004 Jun 1; 119 (1): 56-65

Biagi E, Rousseau RF, Yvon E, Vigouroux S, Dotti G, Brenner MK. **Cancer vaccines: dream, reality, or nightmare?** *Clin Exp Med.* 2002 Nov; 2 (3): 109-18

Boehm T, Folkman J, Browder T and O'Reilly MS. **Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance.** *Nature.* 1997 Nov; 390 (6658): 404-7

Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, Gahn B, Huls MH, Rousseau A, Sixbey J, Gresik MV, Carrum G, Hudson M, Dilloo D, Gee A, Brenner MK, Rooney CM, Heslop HE. **Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease.** *J Exp Med.* 2004 Dec 20; 200 (12): 1623-33

Borges E, Jan Y, Ruoslahti E. **Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain.** *J Biol Chem.* 2000 Dec 22; 275 (51): 39867-73

Borie F, Millat B, Fingerhut A, Hay JM, Fagniez PL, De Saxce B. **Lymphatic involvement in early gastric cancer: prevalence and prognosis in France.** *Arch Surg.* 2000 Oct; 135 (10): 1218-23

Braat AE, Oosterhuis JW, Moll FC, de Vries JE. **Successful sentinel node identification in colon carcinoma using Patent Blue V.** *Eur J Surg Oncol.* 2004 Aug; 30 (6): 633-7

Brand MI, Casillas S, Dietz DW, Milsom JW, Vladisavljevic A. **Development of a reliable colorectal cancer liver metastasis model.** *Surg Res.* 1996 Jul 1; 63 (2): 425-32

Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, **Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium.** *Am J Pathol.* 1999 Feb; 154 (2): 385-94

Brooks PC, Silletti S, von Schalscha TL, Friedlander M, Cheresch DA. **Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity.** *Cell.* 1998 Feb 6; 92 (3): 391-400

Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. **Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.** *Cell.* 1996 May 31; 85 (5): 683-93.

Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF. **Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract.** *Cancer Res.* 1993 Oct 1; 53 (19): 4727-35

Buchhop S, Gibson MK, Wang XW, Wagner P, Sturzbecher HW, Harris CC. **Interaction of p53 with the human Rad51 protein.** *Nucleic Acids Res.* 1997 Oct 1; 25 (19): 3868-74

Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, Jones RT, Borkowski A, Caporaso NA, Fleming M, Trastek V, Pairolero P, Tazelaar H, Midthun D, Jett JR, Liotta LA, Travis WD, Harris CC. **Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma.** *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 1; 11 (1): 232-41

C

Callen E, Surralles J. **Telomere dysfunction in genome instability syndromes.** *Mutat Res.* 2004 Sep; 567 (1): 85-104

Calmels TP, Martin F, Durand H, Tiraby G. **Proteolytic events in the processing of secreted proteins in fungi.** *J Biotechnol.* 1991 Jan; 17 (1): 51-66

Caruso ML, Valentini AM. **Overexpression of p53 in a large series of patients with hepatocellular carcinoma: a clinicopathological correlation.** *Anticancer Res.* 1999 Sep-Oct; 19 (5B): 3853-6

Cass I, Li AJ, Runowicz CD, Fields AL, Goldberg GL, Leuchter RS, Lagasse LD, Karlan BY. **Pattern of lymph node metastases in clinically unilateral stage I invasive epithelial ovarian carcinomas.** *Gynecol Oncol.* 2001 Jan; 80 (1): 56-61

Chagpar A, Kanthan SC. **Vaginal metastasis of colon cancer.** *Am Surg.* 2001 Feb; 67 (2): 171-2

Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Sep 29; 95 (20): 11715-20

Charissoux JL, Grossin L, Leboutet MJ, Rigaud M. **Treatment of experimental osteosarcoma tumors in rat by herpes simplex thymidine kinase gene transfer and ganciclovir.** *Anticancer Res.* 1999 Jan-Feb; 19 (1A): 77-80

Chen WJ, Chang CY, Lin JK. **Induction of G1 phase arrest in MCF human breast cancer cells by pentagalloylglucose through the down-regulation of CDK4 and CDK2 activities and up-regulation of the CDK inhibitors p27(Kip) and p21(Cip).** *Biochem Pharmacol.* 2003 Jun 1; 65 (11): 1777-85

Chiou SK, Rao L, White E. **Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis.** *Mol Cell Biol.* 1994 Apr; 14 (4): 2556-63

Chou JY, Lai SY, Pan SL, Jow GM, Chern JW, Guh JH. **Investigation of anticancer mechanism of thiadiazole-based compound in human non-small cell lung cancer A549 cells.** *Biochem Pharmacol.* 2003 Jul 1; 66 (1): 115-24

Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. **Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR.** *J Biol Chem.* 2002 Feb 1; 277 (5): 3101-8

Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, Morrison SL. **Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction.** *J Immunol Methods.* 1992 Jul 31; 152 (1): 89-104

Colombel M, Symmans F, Gil S, O'Toole KM, Chopin D, Benson M, Olsson CA, Korsmeyer S, Buttyan R. **Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers.** *Am J Pathol.* 1993 Aug; 143 (2): 390-400

Colombo F, Barzon L, Franchin E, Pacenti M, Pinna V, Danieli D, Zanusso M, Palu G. **Combined HSV-TK/IL-2 gene therapy in patients with recurrent glioblastoma multiforme: biological and clinical results.** *Cancer Gene Ther.* 2005 May 13

Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. **Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity.** *EMBO J.* 1992 May; 11 (5): 1921-9

Cox CE, Salud C, Whitehead GF, Reintgen DS. **Sentinel lymph node biopsy for breast cancer: combined dye-isotope technique.** *Breast Cancer.* 2000; 7 (4): 389-97

Craig NL, Nash HA. **E. coli integration host factor binds to specific sites in DNA.** *Cell.* 1984 Dec; 39 (3 Pt 2): 707-16

Croft M. **Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?** *Nat Rev Immunol.* 2003 Aug; 3 (8): 609-20

Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. **VEGF-receptor signal transduction.** *Trends Biochem Sci.* 2003 Sep; 28 (9): 488-94

D

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J, Brown LF, Muzikansky A, Jackson DG, Ellwanger U, Garbe C, Mihm MC, Detmar M. **Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival.** *Am J Pathol.* 2003 Jun; 162 (6): 1951-60

Daffner RH, Kennedy SL, Fox KR, Crowley JJ, Sauser DD, Cooperstein LA. **Synchronous multicentric osteosarcoma: the case for metastases.** *Skeletal Radiol.* 1997 Oct; 26 (10): 569-78

Dejean A, de The H. **Hepatitis B virus as an insertional mutagen in a human hepatocellular carcinoma.** *Mol Biol Med.* 1990 Jun; 7 (3): 213-22

de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. **The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.** *Science.* 1992 Feb 21; 255 (5047): 989-91

Dias S, Choy M, Alitalo K, Rafii S. **Vascular endothelial growth factor (VEGF)-C signaling through FLT-4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy.** *Blood.* 2002 Mar 15; 99 (6): 2179-84

Di Bisceglie AM. **Hepatocellular carcinoma: molecular biology of its growth and relationship to hepatitis B virus infection.** *Med Clin North Am.* 1989 Jul; 73 (4): 985-97

Dong M, Ma G, Tu W, Guo KJ, Tian YL, Dong YT. **Clinicopathological significance of p53 and mdm2 protein expression in human pancreatic cancer.** *World J Gastroenterol.* 2005 Apr 14; 11 (14): 2162-5

Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. **Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance.** *Nucleic Acids Res.* 1990 Jul 11; 18 (13): 4009

Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, Royal RE, Kammula U, White DE, Mavroukakis SA, Rogers LJ, Gracia GJ, Jones SA, Mangiameli DP, Pelletier MM, Gea-Banacloche J, Robinson MR, Berman DM, Filie AC, Abati A, Rosenberg SA. **Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma.** *J Clin Oncol.* 2005 Apr 1; 23 (10): 2346-57

E

Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. **Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura.** *Br J Cancer.* 2003 May 19; 88 (10): 1553-9

Eggert A, Ikegaki N, Kwiatkowski J, Zhao H, Brodeur GM, Himelstein BP. **High-level expression of angiogenic factors is associated with advanced tumor stage in human neuroblastomas.** *Clin Cancer Res.* 2000 May; 6 (5): 1900-8

Esterbauer H. **Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products.** *Am J Clin Nutr.* 1993 May; 57 (5 Suppl): 779-785

F

Fabozzi SJ, Schellhammer PF, el-Mahdi AM. **Pulmonary metastases from prostate cancer.** *Cancer.* 1995 Jun 1; 75 (11): 2706-9

Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. **HIF-1alpha-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis.** *Cancer Res.* 2001 Aug 1; 61(15): 5731-5

Fessard V, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Puiseux-Dao S. **Okadaic acid treatment induces DNA adduct formation in BHK21 C13 fibroblasts and HESV keratinocytes.** *Mutat Res.* 1996 Dec 12; 361 (2-3): 133-41

Fielder W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschrader M, Hossfeld DK. **Expression of FLT4 and its ligand VEGF-C in acute myeloid leukemia.** *Leukemia.* 1997 Aug; 11 (8): 1234-7

Fitzpatrick TE, Lash GE, Yanaihara A, Charnock-Jones DS, Macdonald-Goodfellow SK, Graham CH. **Inhibition of breast carcinoma and trophoblast cell invasiveness by vascular endothelial growth factor.** *Exp Cell Res.* 2003 Feb 15; 283 (2): 247-55

Flendrie M, Creemers MC, Welsing PM, den Broeder AA, van Riel PL. **Survival during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in rheumatoid arthritis.** *Ann Rheum Dis.* 2003 Nov; 62 Suppl 2: ii30-3

Folkman J. **What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?** *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jan; 82 (1): 4-6

Fornabaio DM, Alterman AL, Stackpole CW. **Metastatic dissemination of B16 melanoma: evidence that metastases can result from nonspecific trapping of disseminated tumor cells.** *Invasion Metastasis.* 1988; 8 (1): 1-16

Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. **Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again.** *Differentiation.* 2002 Jan; 69 (4-5): 188-97

Fujisawa T, Yamaguchi Y, Saitoh Y, Hiroshima K, Ohwada H. **Blood and lymphatic vessel invasion as prognostic factors for patients with primary resected nonsmall cell carcinoma of the lung with intrapulmonary metastases.** *Cancer*. 1995 Dec 15; 76 (12): 2464-70

G

Gahn B, Siller-Lopez F, Pirooz AD, Yvon E, Gottschalk S, Longnecker R, Brenner MK, Heslop HE, Aguilar-Cordova E, Rooney CM. **Adenoviral gene transfer into dendritic cells efficiently amplifies the immune response to LMP2A antigen: a potential treatment strategy for Epstein-Barr virus--positive Hodgkin's lymphoma.** *Int J Cancer*. 2001 Sep 1; 93 (5): 706-13

Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, Vick K. **p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer.** *Clin Cancer Res*. 2002 Nov; 8 (11): 3445-53

Geldof AA, Rao BR. **Factors in prostate cancer metastasis.** *Anticancer Res*. 1990 Sep-Oct; 10 (5A): 1303-6

Giarnieri E, Mancini R, Pisani T, Alderisio M, Vecchione A. **Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax expression in invasive and in situ squamous cell carcinoma of the uterine cervix.** *Clin Cancer Res*. 2000 Sep; 6 (9): 3600-6

Ginn SL, Curtin JA, Kramer B, Smyth CM, Wong M, Kakakios A, McCowage GB, Watson D, Alexander SI, Latham M, Cunningham SC, Zheng M, Hobson L, Rowe PB, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, Alexander IE. **Treatment of an infant with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1) by gene therapy in Australia.** *Med J Aust*. 2005 May 2; 182 (9): 458-63

Gisselsson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Dal Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. **Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Oct 23; 98 (22): 12683-8

Giuliano AE. **Intradermal blue dye to identify sentinel lymph node in breast cancer.** *Lancet.* 1997 sept 27; 350 (9082): 958

Goff BA, Kato D, Schmidt RA, Ek M, Ferry JA, Muntz HG, Cain JM, Tamimi HK, Figge DC, Greer BE. **Uterine papillary serous carcinoma: patterns of metastatic spread.** *Gynecol Oncol.* 1994 Sep; 54 (3): 264-8

Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J. **Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity.** *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1998 Jun; 35 (3): 189-237

Gudbrandsdottir S, Bliddal H, Petri A, Terslev L, Danneskiold-Samsøe B, Bjornhart B, Bendtzen K, Muller K. **Plasma TNF binding capacity profiles during treatment with etanercept in rheumatoid arthritis.** *Scand J Rheumatol.* 2004; 33 (6): 385-8

Gurin CC, Federici MG, Kang L, Boyd J. **Causes and consequences of microsatellite instability in endometrial carcinoma.** *Cancer Res.* 1999 Jan 15; 59 (2): 462-6

H

Hahn WC, Meyerson M. **Telomerase activation, cellular immortalization and cancer.** *Ann Med.* 2001 Mar; 33 (2): 123-9

Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B. **The molecular basis of Turcot's syndrome.** *N Engl J Med.* 1995 Mar 30; 332 (13): 839-47

Han HJ, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. **Genomic structure of human mismatch repair gene, hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC).** *Hum Mol Genet.* 1995 Feb ;4 (2): 237-42

Harris H, Miller OJ, Klein G, Worst P, Tachibana T. **Suppression of malignancy by cell fusion.** *Nature.* 1969 Jul 26; 223 (204): 363-8

Hartwell L. **Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells.** *Cell.* 1992 Nov 13; 71 (4): 543-6

Hartwig A, Dally H, Schlegel R. **Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding.** *Toxicol Lett.* 1996 Nov; 88 (1-3): 85-90

Hawes D, Neville AM, Cote RJ. **Occult metastases in patients with breast cancer.** *Ann Surg Oncol.* 2001 Oct; 8 (9 Suppl): 60S-63S

Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. **The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19; 92 (26): 12240-4

Holash J, Davis S, Papadopoulos N, Croll SD, Ho L, Russell M, Boland P, Leidich R, Hylton D, Burova E, Ioffe E, Huang T, Radziejewski C, Bailey K, Fandl JP, Daly T, Wiegand SJ, Yancopoulos GD, Rudge JS. **VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 20; 99 (17): 11393-8

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. **p53 mutations in human cancers.** *Science.* 1991 Jul 5; 253 (5015): 49-53

Hong YK, Foreman K, Shin JW, Hirakawa S, Curry CL, Sage DR, Libermann T, Dezube BJ, Fingerroth JD, Detmar M. **Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpes virus.** *Nat Genet.* 2004 Jul; 36 (7): 683-85

Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, Bohlen P, Senger DR, Detmar M. **VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins.** *FASEB J.* 2004 Jul; 18 (10): 1111-3

Huguier M, Ferro L, Barrier A. **Early gastric carcinoma: spread and multicentricity.** *Gastric Cancer.* 2002; 5 (3): 125-8

Huntsman DG, Clement PB, Gilks CB, Scully RE. **Small-cell carcinoma of the endometrium. A clinicopathological study of sixteen cases.** *Am J Surg Pathol.* 1994 Apr; 18 (4): 364-75

I

Iida K, Nobori T, Matsumine A, Isaka A, Seto M, Shiraishi T, Uchida A. **Effect of retinoblastoma tumor suppressor gene expression on chemosensitivity of human osteosarcoma cell lines.** *Oncol Rep.* 2003 Nov-Dec; 10 (6): 1961-5

Ishii H, Furuse J, Kinoshita T, Konishi M, Nakagohri T, Takahashi S, Gotohda N, Nakachi K, Yoshino M. **Extrahepatic spread from hepatocellular carcinoma: who are candidates for aggressive anti-cancer treatment?** *Jpn J Clin Oncol.* 2004 Dec; 34 (12): 733-9

Issing WJ, Wustrow TP, Oeckler R, Mezger J, Nerlich A. **An association of the RB gene with osteosarcoma: molecular genetic evaluation of a case of hereditary retinoblastoma.** *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1993; 250 (5): 277-80

Iurlaro M, Loverro G, Vacca A, Cormio G, Ribatti D, Minischetti M, Ria R, Bruno M, Selvaggi L. **Angiogenesis extent and expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma.** *Eur J Clin Invest.* 1999 Sep; 29 (9): 793-801

K

Kagohashi K, Satoh H, Ishikawa H, Ohtsuka M, Sekizawa K. **Liver metastasis at the time of initial diagnosis of lung cancer.** *Med Oncol.* 2003; 20 (1): 25-8

Kaina B, Fritz G, Ochs K, Haas S, Grombacher T, Dosch J, Christmann M, Lund P, Gregel CM, Becker K. **Transgenic systems in studies on genotoxicity of alkylating agents: critical lesions, thresholds and defense mechanisms.** *Mutat Res.* 1998 Sep 20; 405 (2): 179-91

Kallio PJ, Okamoto K, O'Brien S, Carrero P, Makino Y, Tanaka H, Poellinger L. **Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha.** *EMBO J.* 1998 Nov 16; 17 (22): 6573-86

Kannan K, Sharpless NE, Xu J, O'Hagan RC, Bosenberg M, Chin L. **Components of the Rb pathway are critical targets of UV mutagenesis in a murine melanoma model.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 4; 100 (3): 1221-5

Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. **Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage.** *Cancer Res.* 1991 Dec 1; 51 (23 Pt 1): 6304-11

Kawakami M, Furuhata T, Kimura Y, Yamaguchi K, Hata F, Sasaki K, Hirata K. **Quantification of vascular endothelial growth factor-C and its receptor-3 messenger RNA with real-time quantitative polymerase chain reaction as a predictor of lymph node metastasis in human colorectal cancer.** *Surgery.* 2003 Mar; 133 (3): 300-8

Khayat CM, Johnston DL. **Rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, and adrenocortical carcinoma in a child with a germline p53 mutation.** *Pediatr Blood Cancer.* 2004 Nov; 43 (6): 683-6

Kim YM, Hwang S, Kim YM, Pyun BJ, Kim TY, Lee ST, Gho YS and Kwon YG. **Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1.** *J Biol Chem.* 2002 Aug; 277 (31): 27872-9

Knudson CM, Johnson GM, Lin Y, Korsmeyer SJ. **Bax accelerates tumorigenesis in p53-deficient mice.** *Cancer Res.* 2001 Jan 15; 61 (2): 659-65

Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MR, Morrison P, Wirth L, Finan PJ, Burn J, Chapman P. **Structure of the human MSH2 locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for msh2 mutations.** *Genomics.* 1994 Dec; 24 (3): 516-26

Krasnici S, Werner A, Eichhorn ME, Schmitt-Sody M, Pahernik SA, Sauer B, Schulze B, Teifel M, Michaelis U, Naujoks K, Dellian M. **Effect of the surface charge of liposomes on their uptake by angiogenic tumor vessels.** *Int J Cancer.* 2003 Jul 1; 105 (4): 561-7

Kuismanen SA, Moisio AL, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P. **Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability.** *Am J Pathol.* 2002 Jun; 160 (6): 1953-8

Kuwashima Y, Uehara T, Kurosumi M, Shiromizu K, Matsuzawa M, Kishi K. **Pathological aspects of normal-sized ovarian carcinoma.** *Eur J Gynaecol Oncol.* 1996; 17 (1): 17-23

L

Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. **Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome.** *Cell*. 2004 Dec 17; 119 (6): 861-72

Latham KM, Eastman SW, Wong A, Hinds PW. **Inhibition of p53-mediated growth arrest by overexpression of cyclin-dependent kinases.** *Mol Cell Biol*. 1996 Aug ;16 (8): 4445-4455.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. **DNA methylation and genetic instability in colorectal cancer cells.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 ; 94 : 2545-50

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. **Genetic instabilities in human cancers.** *Nature*. 1998 Dec 17; 396 (6712): 643-9

Leonard JC, Leonard RC, Thompson KH. **Arabinofuranosyl nucleosides induce common fragile sites.** *Hum Genet*. 1988 Jun; 79 (2): 157-62

Levine AJ, Perry ME, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. **The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis.** *Br J Cancer*. 1994 Mar; 69 (3): 409-16

LeRoux PD, Berger MS, Elliott JP, Tamimi HK. **Cerebral metastases from ovarian carcinoma.** *Cancer*. 1991 Apr 15; 67 (8): 2194-9

Lewtas J, Lewis C, Zweidinger R, Stevens R, Cupitt L. **Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air.** *Pharmacogenetics*. 1992 Dec; 2 (6): 288-96

Li B, Ding J, Larson A, Song S. **Tumor tissue recycling--a new combination treatment for solid tumors: experimental and preliminary clinical research.** *In Vivo*. 1999 Sep-Oct; 13 (5): 433-8

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, Housman DE, Jacks T. **p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo.** *Science*. 1994 Nov 4; 266 (5186): 807-10

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem*. 1951 Nov; 193 (1): 265-75

Longhurst CM, Jennings LK. **Integrin-mediated signal transduction.** *Cell Mol Life Sci*. 1998 Jun; 54 (6): 514-26

M

Ma TH, Harris MM. **Review of the genotoxicity of formaldehyde.** *Mutat Res*. 1988 Jul; 196 (1): 37-59

MacDonnell TJ, Navone NM, Troncoso P, Pisters LL, Conti C, von Eschenbach AC, Brisbay S, Logothetis CJ. **Expression of bcl-2 oncoprotein and p53 protein accumulation in bone marrow metastases of androgen independent prostate cancer.** *J Urol*. 1997 Feb; 157 (2): 569-74

Mai KT, Landry DC, Robertson SJ, Commons AS, Burns BF, Thijssen A, Collins J. **A comparative study of metastatic renal cell carcinoma with correlation to subtype and primary tumor.** *Pathol Res Pract*. 2001; 197 (10): 671-5

Mandai M, Konishi I, Koshiyama M, Komatsu T, Yamamoto S, Nanbu K, Mori T, Fujii S. **Ascitic positive cytology and intraperitoneal metastasis in ovarian dysgerminoma.** *J Obstet Gynaecol Res*. 1996 Feb; 22 (1): 89-94

Marmorstein LY, Ouchi T, Aaronson SA. **The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10; 95 (23): 13869-74

Maruyama H, Higuchi M, Higuchi N, Kameda S, Saito M, Sugawa M, Matsuzaki J, Neichi T, Yokoyama S, Miyazaki Y, Miyazaki J, Gejyo F. **Post-secretion neutralization of transgene-derived effect: soluble erythropoietin receptor/IgG1Fc expressed in liver neutralizes erythropoietin produced in muscle.** *J Gene Med.* 2004 Feb; 6 (2): 228-37

McColl BK, Baldwin ME, Roufail S, Freeman C, Moritz RL, Simpson RJ, Alitalo K, Stacker SA, Achen MG. **Plasmin activates the lymphangiogenic growth factors VEGF-C and VEGF-D.** *J Exp Med.* 2003 Sep 15; 198 (6): 863-8

Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, Siegel EL, Cohen SB, Ory P, Salonen D, Rubenstein J, Sharp JT, Tsuji W. **Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression.** *Arthritis Rheum.* 2004 Jul; 50 (7): 2264-72

Meister B, Grunebach F, Bautz F, Brugger W, Fink FM, Kanz L, Mohle R. **Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in human neuroblastoma.** *Eur J Cancer.* 1999 Mar; 35 (3): 445-9

Meyer M, Clauss M, Lepple-Wienhues A, Waltenberger J, Augustin HG, Ziche M, Lanz C, Buttner M, Rziha HJ, Dehio C. **A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases.** *EMBO J.* 1999 Jan 15; 18 (2): 363-74

Milde-Langosch K, Ocon E, Becker G, Loning T. **p16/MTS1 inactivation in ovarian carcinomas: high frequency of reduced protein expression associated with hypermethylation or mutation in endometrioid and mucinous tumors.** *Int J Cancer.* 1998 Feb 20; 79 (1): 61-5

Monni O, Joensuu H, Franssila K, Klefstrom J, Alitalo K, Knuutila S. **BCL2 overexpression associated with chromosomal amplification in diffuse large B-cell lymphoma.** *Blood.* 1997 Aug 1; 90 (3): 1168-74

Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwitz DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Blosch CM, Lange ML, McDonnell ND, Weinblatt ME. **Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial.** *Ann Intern Med.* 1999 Mar 16; 130(6): 478-86

Moriarty TJ, Huard S, Dupuis S, Autexier C. **Functional multimerization of human telomerase requires an RNA interaction domain in the N terminus of the catalytic subunit.** *Mol Cell Biol.* 2002 Feb; 22 (4): 1253-65

Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, Jain RK. **LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down regulation in human liver cancer and cirrhosis.** *Cancer Res.* 2001 Nov 15; 61 (22): 8079-84

Moyon D, Pardanaud L, Yuan L, Breant C, Eichmann A. **Plasticity of endothelial cells during arterial-venous differentiation in the avian embryo.** *Development.* 2001 Sep; 128 (17): 3359-70

Muller C, Calsou P, Frit P, Cayrol C, Carter T, Salles B. **UV sensitivity and impaired nucleotide excision repair in DNA-dependent protein kinase mutant cells.** *Nucleic Acids Res.* 1998 Mar 15; 26 (6): 1382-9

Mulsant P, Gatignol A, Dalens M, Tiraby G. **Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells.** *Somat Cell Mol Genet.* 1988 May; 14 (3): 243-52

Murray KM, Dahl SL. **Recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75) Fc fusion protein (TNFR:Fc) in rheumatoid arthritis.** *Ann Pharmacother.* 1997 Nov; 31 (11): 1335-8

N

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, Yang Q, Imabun S, Nakahara M, Nakao K, Nakamura M, Mori I, Kakudo K. **Flt-4-positive vessel density correlates with vascular endothelial growth factor-d expression, nodal status, and prognosis in breast cancer.** *Clin Cancer Res.* 2003 Nov 1; 9 (14): 5313-7

Nieder C, Grosu AL, Grzadziel A, Schlegel J, Molls M. **Brain metastases in renal cell cancer: diagnostic and therapeutic aspects.** *Am J Clin Oncol.* 2004 Dec; 27 (6): 632-4

Nisato RE, Harrison JA, Buser R, Orci L, Rinsch C, Montesano R, Dupraz P, Pepper MS. **Generation and characterization of telomerase-transfected human lymphatic endothelial cells with an extended life span.** *Am J Pathol.* 2004 Jul; 165 (1):11-24

O

Oda S, Maehara Y, Ikeda Y, Oki E, Egashira A, Okamura Y, Takahashi I, Kakeji Y, Sumiyoshi Y, Miyashita K, Yamada Y, Zhao Y, Hattori H, Taguchi K, Ikeuchi T, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Karran P, Yoshida MA. **Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability.** *Nucleic Acids Res.* 2005 Mar 18; 33 (5): 1628-36

Oliver G, Sosa-Pineda B, Geisendorf S, Spana EP, Doe CQ, Gruss P. **Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development.** *Mech Dev.* 1993 Nov; 44 (1): 3-16

O'Reilly MS, Holmgren L, Chen C and Folkman J. **Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice.** *Nat Med.* 1996 Jun; 2 (6): 689-92

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH and Folkman J. **Angiostatin: a circulating endothelial cell inhibitor that suppresses angiogenesis and tumor growth.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994; 59: 471-82

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Cao Y, Moses M, Lane WS, Sage EH and Folkman J. **Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma.** *Cell.* 1994 Oct; 79 (2): 315-28

O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR and Folkman J. **Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth.** *Cell.* 1997 Jan; 88 (2): 277-85

P

Padera TP, Kadambi A, di Tomaso E, Carreira CM, Brown EB, Boucher Y, Choi NC, Mathisen D, Wain J, Mark EJ, Munn LL, Jain RK. **Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics.** *Science.* 2002 Jun 7; 296 (5574): 1883-6

Partanen TA, Paavonen K. **Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans.** *Microsc Res Tech.* 2001 Oct 15; 55 (2): 108-21

Pepper MS, Tille JC, Nisato R, Skobe M. **Lymphangiogenesis and tumor metastasis.** *Cell Tissue Res.* 2003 Oct; 314 (1): 167-177

Plate KH, Breier G, Weich HA, Mennel HD, Risau W. **Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms.** *Int J Cancer.* 1994 Nov 15; 59 (4): 520-9

Ponder BA. **Cancer genetics.** *Nature.* 2001 May 17; 411 (6835): 336-41

Poppema S, Potters M, Visser L, van den Berg AM. **Immune escape mechanisms in Hodgkin's disease.** *Ann Oncol.* 1998; 9 Suppl 5: S21-4

Porter GJ, Evans AJ, Pinder SE, James JJ, Cornford EC, Burrell HC, Chan SY, Cheung KL, Robertson JF. **Patterns of metastatic breast carcinoma: influence of tumour histological grade.** *Clin Radiol.* 2004 Dec; 59 (12): 1094-8

Prevo R, Banerji S, Ferguson DJ, Clasper S, Jackson DG. **Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium.** *J Biol Chem.* 2001 Jun; 19420-30

R

Raffo AJ, Perlman H, Chen MW, Day ML, Streitman JS, Buttyan R. **Overexpression of bcl-2 protects prostate cancer cells from apoptosis in vitro and confers resistance to androgen depletion in vivo.** *Cancer Res.* 1995 Oct 1; 55 (19): 4438-45

Renard AJ, Veth RP, Schreuder HW, Pruszczynski M, Bokkerink JP, van Hoesel QG, van Der Staak FJ. **Osteosarcoma: oncologic and functional results. A single institutional report covering 22 years.** *J Surg Oncol.* 1999 Nov; 72 (3): 124-9

Risau W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Nature.* 1997 Apr 17; 386 (6626): 671-4

Rosenberg SA. **Progress in human tumour immunology and immunotherapy.** *Nature.* 2001 May 17; 411 (6835): 380-4

Rousseau RF, Haight AE, Hirschmann-Jax C, Yvon ES, Rill DR, Mei Z, Smith SC, Inman S, Cooper K, Alcoser P, Grilley B, Gee A, Popek E, Davidoff A, Bowman LC, Brenner MK, Strother D. **Local and systemic effects of an allogeneic tumor cell vaccine combining transgenic human lymphotactin with interleukin-2 in patients with advanced or refractory neuroblastoma.** *Blood.* 2003 Mar 1; 101 (5): 1718-26

Rygaard K, Vindelov LL, Spang-Thomsen M. **Expression of myc family oncoproteins in small-cell lung-cancer cell lines and xenografts.** *Int J Cancer.* 1993 Apr 22; 54 (1): 144-52

S

Sagman U, Maki E, Evans WK, Warr D, Shepherd FA, Sculier JP, Haddad R, Payne D, Pringle JF, Yeoh JL, Ciampi A, DeBoer G, McKinney S, Ginsberg R, Feld R. **Small-cell carcinoma of the lung: derivation of a prognostic staging system.** *J Clin Oncol.* 1991 Sep; 9 (9): 1639-49

Saharinen P, Tammela T, Karkkainen MJ, Alitalo K. **Lymphatic vasculature: development, molecular regulation and role in tumor metastasis and inflammation.** *Trends in immunology.* 2004 Jul; 25 (7): 387-95

Saitoh H, Yoshida K, Uchijima Y, Kobayashi N, Suwata J, Kamata S. **Two different lymph node metastatic patterns of a prostatic cancer.** *Cancer.* 1990 Apr 15; 65 (8): 1843-6

Salceda S, Caro J. **Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.** *J Biol Chem.* 1997 Sep 5; 272 (36): 22642-7

Sanchez-Madrid F, Simon P, Thompson S, Springer TA. **Mapping of antigenic and functional epitopes on the alpha- and beta-subunits of two related mouse glycoproteins involved in cell interactions, LFA-1 and Mac-1.** *J Exp Med.* 1983 Aug 1; 158 (2): 586-602

Sharpe RW, Rector JT, Rushin JM, Garvin DF, Cotelingam JD. **Splenic metastasis in hairy cell leukemia.** *Cancer.* 1993 Apr 1; 71 (7): 2222-6

Shibuya M. **Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis.** *Cell Struct Funct.* 2001 Feb; 26 (1): 25-35

Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, Sasazuki T. **Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras.** *Science*. 1993 Apr 2; 260 (5104): 85-8

Si MS, Amersi F, Golish SR, Ortiz JA, Zaky J, Finklestein D, Busuttill RW, Imagawa DK. **Prevalence of metastases in hepatocellular carcinoma: risk factors and impact on survival.** *Am Surg*. 2003 Oct; 69 (10): 879-85

Skoldenberg EG, Christiansson J, Sandstedt B, Larsson A, Lackgren G and Christofferson. **Angiogenesis and angiogenic growth factors in Wilms tumor.** *J Urol*. 2001 Jun; 165 (6Pt2): 2274-9

Slavc I, Ellenbogen R, Jung WH, Vawter GF, Kretschmar C, Grier H, Korf BR. **myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma.** *Cancer Res*. 1990 Mar 1; 50 (5): 1459-63

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F. **Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2.** *EMBO J*. 1999 Feb 15; 18 (4): 882-92

Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. **The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread.** *Faseb J*. 2002 Jul; 16 (9): 922-34

Stenbygaard LE, Sorensen JB, Larsen H, Dombernowsky P. **Metastatic pattern in non-resectable non-small cell lung cancer.** *Acta Oncol*. 1999; 38 (8): 993-8

Strissel PL, Strick R, Rowley JD, Zeleznik-Le NJ. **An in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region.** *Blood*. 1998 Nov 15; 92 (10): 3793-803

Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R. **Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration.** *J Immunol.* 1995 Nov 15; 155 (10): 5038-45

Sugawara N, Paques F, Colaiacovo M, Haber JE. **Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19; 94 (17): 9214-9

Sugi K, Kitada K, Yoshino M, Hirazawa K, Matsuda E, Azuma T, Umemori Y. **New method of visualizing lymphatics in lung cancer patients by multidetector computed tomography.** *J Comput Assist Tomogr.* 2005 Mar-Apr; 29 (2): 210-4

Swartz MA, Skobe M. **Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis.** *Microsc Res Tech.* 2001 Oct 15; 55 (2): 92-9

T

Taback B, Hashimoto K, Kuo CT, Chan A, Giuliano AE, Hoon DS. **Molecular lymphatic mapping of the sentinel lymph node.** *Am J Pathol.* 2002 Oct; 161 (4): 1153-61

Tabbara WS, Mehio AR. **Metastatic patterns of bladder carcinoma.** *Prog Clin Biol Res.* 1984; 162A: 145-60

Tannenbaum SR. **Comparative metabolism of tamoxifen and DNA adduct formation and in vitro studies on genotoxicity.** *Semin Oncol.* 1997 Feb; 24 (1 Suppl 1): S1-81-S1-6

Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM. **Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice.** *J Clin Invest.* 1998 Apr 1; 101 (7): 1401-13

Tlsty TD, Jonczyk P, White A, Sage M, Hall I, Schaefer D, Briot A, Livanos E, Roelofs H, Poulouse B. **Loss of chromosomal integrity in neoplasia.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1993; 58: 645-54

Tongaonkar HB, Dandekar NP, Dalal AV, Kulkarni JN, Kamat MR. **Renal cell carcinoma extending to the renal vein and inferior vena cava: results of surgical treatment and prognostic factors.** *J Surg Oncol.* 1995 Jun; 59 (2): 94-100

Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, Milling A, Thiemann M, Sharav T, Sparbier K, Sterry W, Walden P. **Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: immunological effects and clinical results.** *Vaccine.* 2005 Mar 18; 23 (17-18): 2367-73

Tso CL, McBride WH, Sun J, Patel B, Tsui KH, Paik SH, Gitlitz B, Caliliw R, van Ophoven A, Wu L, deKernion J, Belldegrin A. **Androgen deprivation induces selective outgrowth of aggressive hormone-refractory prostate cancer clones expressing distinct cellular and molecular properties not present in parental androgen-dependent cancer cells.** *Cancer J.* 2000 Jul-Aug; 6 (4): 220-33

Tsujimoto Y, Bashir MM, Givol I, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. **DNA rearrangements in human follicular lymphoma can involve the 5' or the 3' region of the bcl-2 gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Mar; 84 (5): 1329-31

Turner RR, Ollila DW, Stern S, Giuliano AE. **Optimal histopathological examination of the sentinel lymph node for breast carcinoma staging.** *Am J Surg Patol.* 1999; 23 (3): 262-7

V

Valtola R, Salven P, Heikkila P, Taipale J, Joensuu H, Rehn M, Pihlajaniemi T, Weich H, deWaal R, Alitalo K. **VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer.** *Am J Pathol.* 1999 May; 154(5):1381-90

Viadana E, Bross ID, Pickren JW. **An autopsy study of the metastatic patterns of human leukemias.** *Oncology*. 1978; 35 (2): 87-96

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G. **Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PlGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines.** *Oncogene*. 1995 Oct 19; 11 (8): 1569-79

Vignola S, Picco P, Falcini F, Sabatini F, Buoncompagni A, Gattorno M. **Serum and synovial fluid concentration of vascular endothelial growth factor in juvenile idiopathic arthritides.** *Rheumatology*. 2002 Jun; 41 (6): 691-6

W

Wang J, Chenivesse X, Henglein B, Brechot C. **Hepatitis B virus integration in a cyclin A gene in a hepatocellular carcinoma.** *Nature*. 1990 Feb 8; 343 (6258): 555-7

Weidner N. **Intratumoral microvessel density as a prognostic factor in cancer.** *Am J Pathol*. 1995 Jul; 147 (1): 9-19

Weinblatt ME, Kremer JM, Bankhurst AD, Bulpitt KJ, Fleischmann RM, Fox RI, Jackson CG, Lange M, Burge DJ. **A trial of etanercept, a recombinant tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein, in patients with rheumatoid arthritis receiving methotrexate.** *N Engl J Med*. 1999 Jan 28; 340 (4): 253-9

Wendling D, Toussiot E. **Anti-TNF-alpha therapy in ankylosing spondylitis.** *Expert Opin Pharmacother*. 2004 Jul; 5 (7): 1497-507.

Witte D, Thomas A, Ali N, Carlson N, Younes M. **Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma.** *Anticancer Res*. 2002 May-Jun; 22 (3): 1463-6

Y

Yagi OK, Akiyama Y, Nomizu T, Iwama T, Endo M, Yuasa Y. **Proapoptotic gene BAX is frequently mutated in hereditary nonpolyposis colorectal cancers but not in adenomas.** *Gastroenterology*. 1998 Feb; 114 (2): 268-74

Z

Zinovieva RD, Duncan MK, Johnson TR, Torres R, Polymeropoulos MH, Tomarev SI. **Structure and chromosomal localization of the human homeobox gene Prox1.** *Genomics* 1996 Aug 1; 35 (3): 517-22

ANNEXES

Publications

Title: VEGFR-3, VEGF-C and VEGF-D mRNA expression in cells of human origin

Authors: Dany Leclers, Karine Durand*, Jeanne Cook-Moreau, H el ene Rabinovitch-Chable, Franck G. Sturtz, Michel Rigaud

Adresses :

Department of Medicinal Biochemistry, Faculty of Medicine, Limoges, France.

* **Corresponding author :** Karine Faucher, Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Limoges, 2, Rue du Dr. Raymond Marcland, F-87025 Limoges, France. Phone : +(33)5 55 05 63 41 ; Fax : + (33)5 55 05 64 02, Email address : karine.faucher@unilim.fr

Key words: lymphangiogenesis, VEGFR-3, VEGF-C, VEGF-D, mRNA quantification, tumor cells

Running title: VEGFR-3 and its ligands mRNA levels

Abstract

Lymphangiogenesis plays an important role in tumor growth and metastatic diffusion. Tumor cells produce growth factors such as VEGF-C and VEGF-D which bind to and activate the VEGFR-3 receptor mainly expressed on lymphatic endothelial cells. Endothelial cells migrate towards the tumor site, where they create a microvascular network for tumor supply and dissemination. VEGFR-3 expression has been reported for cells other than lymphatic endothelial ones, which suggests other functions besides microvasculature building for this receptor. Therefore we quantified VEGFR-3 and its ligands VEGF-C and VEGF-D mRNA expression in 17 different cell types of human origin, by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR). We found that, in contrast to VEGF-D, VEGFR-3 and VEGF-C mRNA were not expressed in all of the studied cell types. In addition, as blood cells expressed relatively high VEGFR-3 mRNA levels, compared to solid tumor cells, the possible function of this expression in tumor aggressivity and capacity to invade tissues is also discussed. qRT-PCR would be an accurate tool for deciphering VEGFR-3 and respective ligands functions in tumorigenic mechanisms.

Title : Inhibition of the development of human lymphatic cells hTERT-HDLEC by utilisation of circulating receptors VEGFR-3

Autors : Dany **Leclers**^{1*}, Aurélie **Dutour**², Karine **Faucher-Durand**¹, Michel **Rigaud**¹, Franck **Sturtz**¹

Adresses :

¹ Department of Medical Biochemistry School of Medicine, University of Limoges, 2 rue Dr Raymond Marcland, 87042 Limoges, France.

² Center for Cell and Gene therapy, Houston, Texas USA

* **Corresponding author** : Dany Leclers, Laboratory of Biochemistry, School of Medicine, University of Limoges, 2, Rue du Dr. Raymond Marcland, F-87025 Limoges, France. Phone : +(33)5 55 05 63 41 ; Fax : + (33)5 55 05 64 02, Email address : dany.leclers@unilim.fr

Keywords : Lymphangiogenesis, cancer, metastasis, VEGF, VEGFR-3

Liste des Tableaux et Figures

Figure B1 : La transition G1/S du cycle cellulaire.....	28
Figure B2 : Régulation du cycle cellulaire par les complexes cyclines/cdk.....	29
Figure B3 : Intervention de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.....	31
Figure B4 : Régulation du cycle cellulaire et dommages de l'ADN.....	33
Tableau B1 : Types de dommages de l'ADN suivant le stress cellulaire.....	37
Figure B5 : Principe du raccourcissement des télomères.....	41
Figure B6 : Principe général de l'angiogenèse tumorale.....	47
Figure B7 : Les étapes de l'angiogenèse tumorale.....	49
Figure B8 : Facteurs de croissance et récepteurs des synthèses vasculaires.....	50
Figure B9 : Structure générale des intégrines.....	52
Figure B10 : Mécanisme d'activation de la lymphangiogenèse.....	52
Figure B11 : Transformation du stroma au cours de l'évolution tumorale.....	55
Figure B12 : Les différentes voies de la dissémination métastatique.....	68
Tableau B2 : Incidence des métastases sur différents organes.....	76
Figure B13 : Modification génétique des cellules tumorales.....	83
Figure B14 : Représentation schématique des récepteurs circulants VEGF-Trap.....	86
Figure B15 : Protéine de fusion humaine TNFRp75 (TNFR2) / Fc-IgG1.....	88
Figure M1 : Principe de la coculture verticale.....	96

Figure M3 : Programation des cycles thermiques pour la transcription inverse.....	103
Figure M4 : Programmation des cycles thermiques pour la réaction de polymérisation en chaîne.....	105
Figure M5 : Carte du plasmide pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®] (Invitrogen).....	106
Figure M6 : Carte du plasmide pFRT/lacZeo2 (Invitrogen).....	113
Figure M7 : Structure moléculaire de la zéocine (Invitrogen).....	114
Figure M8 : Carte du plasmide pOG44 (Invitrogen).....	115
Figure M9 : Production des récepteurs circulants VEGFR-3 par le système Flp-In....	116
Figure R1 : Structure du récepteur humain au VEGFR-3 et du site de liaison aux facteurs de croissance VEGF-C ou -D.....	127
Figure R2 : Séquence des acides aminés correspondant aux différents domaines de la protéine humaine VEGFR-3.....	128
Figure R3 : Electrophorèse des fragments hVEGFR-3 obtenus après RT-PCR à partir des ARNm de cellules HEL.....	130
Figure R4 : Vecteur d'expression pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA après intégration de la séquence codante hVEGFR-3 d'intérêt.....	132
Figure R5 : Vérification du clonage de hVEGFR-3 par digestion enzymatique <i>Pvu II</i>	134
Figure R6 : Séquençage du clone 19 hVEGFR-3 (amorces sens T7).....	136
Figure R7 : Séquençage du clone 19 hVEGFR-3 (amorces antisens Bgh).....	137
Figure R8 : Isolement et amplification des clones cellulaires CHO/pFRT.....	138
Figure R9 : Isolement et amplification des clones cellulaires producteurs des récepteurs circulants CHO-RC.....	139

Figure R10 : Vérification de l'intégration des vecteurs pSecTag/FRT/V5-His TOPO[®]TA/hVEGFR-3 dans le génome des cellules CHO.....	141
Figure R11 : Détection de l'expression des récepteurs circulants VEGFR-3 d'origine humaine (RC hVEGFR-3) par Western Blot.....	143
Figure R12 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC, CHO (non transfectées), CHO/pFRT et CHO-RC (productrices des récepteurs circulants) en présence de VEGF-C (200ng/mL).....	146
Figure R13 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC, CHO, CHO/pFRT et CHO-RC en présence de VEGF-D (200ng/mL).....	147
Figure R14 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC en coculture avec les cellules CHO productrices des récepteurs circulants, en présence de VEGF-C (200 ng/mL).....	150
Figure R15 : Courbes de croissance comparatives des cellules hTERT-HDLEC en co-culture avec les cellules CHO productrices des récepteurs circulants, en présence de VEGF-D (200 ng/mL).....	151
Figure R16 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au SVF (50 %).....	153
Figure R17 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200 ng/mL).....	154
Figure R18 : Inhibition de la migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200ng/mL) par les récepteurs circulants.....	154
Figure R19 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL).....	155
Figure R20 : Inhibition de la migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200ng/mL) par les récepteurs circulants.....	156

Figure R21 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO non transfectées : SNT).....	157
Figure R22 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO non transfectées : SNT).....	157
Figure R23 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-C (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).....	158
Figure R24 : Migration des cellules hTERT-HDLEC en réponse au VEGF-D (200 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).....	159
Figure R25 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de gélatine.....	160
Figure R26 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène.....	161
Figure R27 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-A (150 ng/mL).....	162
Figure R28 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-A (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.....	163
Figure R29 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-C (150 ng/mL).....	164
Figure R30 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-C (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.....	165
Figure R31 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-D (150 ng/mL).....	166

Figure R32 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-D (150 ng/mL) en présence de récepteurs circulants.....	167
Figure R33 : Culture de cellules hTERT-HDLEC sur matrice de collagène avec VEGF-D (150 ng/mL) avec contrôle (surnageant des cellules CHO transfectées par le plasmide vide : PV).....	167
Tableau R1 : Valeurs des « crossing-points » (Cp) pour chaque gène en fonction de la concentration en ADNc.....	170
Figure R34 : Gammes d’amplification par RT-PCR quantitative des ADNc obtenus à partir des ARNm de cellules A549.....	171
Figure R35 : Gammes d’amplification par RT-PCR quantitative des ADNc obtenus à partir des ARNm de cellules A549.....	172
Figure R36 : Courbes de fusion caractéristiques de l’ADNc amplifié.....	174
Tableau R2 : Expression des ARNm de VEGF-C, VEGF-D et VEGFR-3 dans différents types cellulaires.....	176
Figure R37 : Détection du ganglion sentinelle par injection de traceur radioactif chez le rat.....	178
Figure R38 : Localisation puis excision du ganglion sentinelle par marquage radioactif	179