

**UNIVERSITE DE LIMOGES**



**ECOLE DOCTORALE EDT4**

**FACULTE de Médecine**

**EA4021 Biomolécules et Thérapies Anti-tumorales**

**Thèse N° [ ]**

# **Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges**

**Discipline / Spécialité : Biologie Santé**

**Présentée et soutenue par Séverine MOLLARD**

**Le 13 décembre 2011**

## **Relargage de chimiothérapies par un hydrogel biocompatible résorbable**

**Thèse dirigée par Pr Franck Sturtz**

**JURY :**

**Mr le Docteur Michel VERT, Directeur émérite du CNRS**

**Rapporteur**

**Mr le Docteur Bernard ROYER**

**Rapporteur**

**Mr le Docteur Fabrice LALLOUE**

**Examineur**

**Mr le Professeur Franck STURTZ**

**Examineur**

**Mr le Docteur Claude COUQUET**

**Examineur invité**

**Mr le Docteur Anh NGUYEN**

**Examineur invité**

*A Matthieu, sans toi rien n'aurait été possible*

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Docteur Michel Vert,**

C'est un plaisir et un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger ce travail en tant que rapporteur. Compte tenu de votre grande expérience dans le domaine des polymères, j'apprécie particulièrement votre participation à mon jury. Je vous remercie du temps que vous avez bien voulu m'accorder. Croyez à ma plus vive reconnaissance et à l'expression de mon profond respect.

### **A Monsieur le Docteur Bernard Royer**

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. Merci aussi pour votre accueil au sein de votre laboratoire de pharmacologie, pour m'avoir donné quelques pistes sur mon sujet de recherche et pour m'avoir permis de réaliser mes premiers dosages HPLC. Soyez assuré, Monsieur, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

### **A Monsieur le Docteur Fabrice Lalloué**

Pour m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de ce travail, d'accepter de participer à ce jury de thèse et tous vos conseils pré-soutenance. Soyez assuré Monsieur tout mon respect et de ma profonde gratitude.

### **A Monsieur le Docteur Claude Couquet**

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury de Thèse. Soyez assuré, Monsieur, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

### **A Monsieur le Professeur Franck Sturtz**

Je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre laboratoire pour y réaliser ma thèse sur ce projet en collaboration avec la société MedinCell SA. Je vous remercie pour votre confiance et vos conseils. Vous m'avez permis d'apprendre le calme et la persévérance face aux aléas de la recherche.

### **A Monsieur le Docteur Anh Nguyen**

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de participer à ce jury en tant que membre invité et pour la collaboration réalisée sur ces trois années de thèse. A chacune de mes venues sur le site de MedinCell, nos échanges ont toujours été très bénéfiques pour moi. Soyez assuré Monsieur tout mon respect et de ma profonde gratitude.

Un travail de thèse ne s'effectue jamais seul et par conséquent beaucoup de personnes m'ont aidé durant ces quatre ans ; je tiens donc à remercier

**Monsieur de Docteur Yoanne Mousseau,** Je tenais à te remercier pour ton aide précieuse et pour ton investissement au cours de ma thèse. Tu as été pour moi, une sorte de mentor, je te remercie pour tous tes conseils prônés durant ces 3 années. Grâce à nos précieux échanges, pas à pas tu as su me guider que ce soit d'un point de vu technique ou plus conceptuel, ainsi tu m'as souvent aidé à y voir plus clair et à ne pas baisser les bras. Ces quelques lignes ne suffiront pas à exprimer toute la gratitude que je ressens envers toi. Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et ta petite famille, ainsi qu'une belle réussite dans la filière pharmacie.

**Mademoiselle Angélique Nizou,** Parce que tu es magique, plus qu'une simple collègue, tu es devenue une amie. Pendant ces trois ans tu as été constamment à mes côtés, ta gentillesse et ta bonne humeur sont un vrai rayon de soleil. Ton aide m'a été vraiment précieuse particulièrement au cours de ces dernières semaines, pour la finalisation du manuscrit, tes relectures avisées et ta patience pour la mise en page ont rendu cela possible. Sois assurée de mon amitié et de ma profonde reconnaissance.

**Madame Laurence Richard,** Je tenais à te remercier pour ton aide tout au long de ma thèse que ce soit par ton savoir-faire, ta bonne humeur, ton positivisme à tout épreuve ou toutes nos discussions. Merci de m'avoir donné la chance d'obtenir de jolies coupes histologiques et d'avoir persévéré pour l'obtention des coupes de polymères. Je te souhaite une très belle thèse avec tout plein de beaux articles !

**Madame de Docteur Jeanne Cook-Moreau,** Tes qualités humaines et scientifiques font de toi une personne d'exception. Si je devais décrire comment j'aimerais me voir dans quelques années, je pense que tu t'en rapprocherais beaucoup. Je te remercie pour ta constante bienveillance à mon égard. Sois assurée de ma profonde affection et reconnaissance.

**Monsieur le Docteur Yasser Baaj,** Je te remercie d'avoir partagé ton expérience et ta gentillesse. Les conseils que tu m'as prodigués pour la rédaction en anglais, m'ont été d'une grande utilité au cours de la rédaction de mes articles. Sois assuré de mon affection et de ma reconnaissance. Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et ta petite famille.

**Monsieur de Professeur Benoit Fulanot,** Merci pour votre aide lors de la rédaction de ma revue et pour les conseils bienveillants que vous m'avez transmis. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

**Monsieur le Docteur Serge Battu,** Je tenais à vous remercier pour m'avoir permis d'utiliser votre matériel HPLC et pour tous vos conseils concernant cette méthode de dosage.

**Monsieur Adama Ouedraogo,** je tenais à te remercier pour ta gentillesse et les moments agréables passés en ta compagnie. Je te souhaite de terminer ta thèse dans de bonnes conditions et beaucoup de bonheur par la suite.

**Melle le Docteur Angélique Guillaudeau,** Grâce à ton sens de la pédagogie, tu as su m'inculquer les bases de l'anatomopathologie. Merci pour le temps que tu m'as accordé, et pour les moments de détente en ta compagnie à Egleton.

**Melle Christelle Gady,** Ma deuxième super colloc'... Merci pour m'avoir accueillie et supportée ces derniers mois un peu tendus ! L'ambiance chaleureuse qui se dégage de votre maisonnée m'a énormément aidé pour ces derniers mois.

**Melle Aurore Danigo,** je te remercie pour la relecture attentive de mon manuscrit. Je te souhaite une belle réussite pour ta thèse.

**Monsieur de Professeur Jacques Monteil,** Merci pour votre aide, et pour les connaissances sur le PET-Scan partagées avec moi. Vos conseils scientifiques m'ont été d'une grande utilité.

**Monsieur le Docteur Michel Bérard,** Je tenais à vous remercier pour m'avoir permis d'obtenir mes premiers dosages de PTX, grâce à vous j'ai été initié au monde de l'HPLC-UC.

**A Monsieur Jacques Demoment,** Je tenais à vous remercier pour votre sympathie et pour les bons soins que vous avez prodigué à mes animaux au cours de ces trois années. Votre respect et votre sens éthique envers eux, font que j'ai toujours eu toute confiance en leur état de santé. Grâce à vous mes expérimentations ont pu se dérouler de la meilleure manière qu'il soit. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Merci aussi à nos petit(e)s stagiaires de passage, leur bonne humeur et leur aide ponctuelle m'ont permis de passer d'agréables moments. Merci Millie pour ta gentillesse sans bornes et pour ton aide lors des « grosses manipulations de greffe », depuis ton départ le labo a perdu un peu de sa gaité. Merci Jim-Jim pour ta sympathie, nos moments de franche rigolade et ton coup de main pour la remise en place du modèle de greffe d'ostéosarcome. Merci à Raph pour ton positivisme et pour m'avoir fait découvrir la bogossitude.

Merci aussi à toutes les autres personnes qui ont de près ou de loin, même sans s'en rendre compte parfois, ont participé à faire de cette thèse un moment agréable, en me soutenant ou en étant juste là quand j'en ai eu besoin.

#### **A mes amis,**

A tous ceux et celles qui n'ont jamais rien compris à ce que je faisais et à quoi cela allait me mener, à tous ceux et celles qui ont du mal à comprendre mes sacrifices, mes oublis et mes abandons, à tous ceux et celles qui m'ont tout simplement soutenus et aimés pour ce que je suis. Que vous soyez Limougeauds, Isérois, Strasbourgeois, Marseillais ou bien expatriés de l'autre côté de l'Atlantique, merci d'avoir été là pendant toutes ces années, votre présence a rendu mon parcours bien plus agréable. Grâce à vous je sais que je ne perds jamais le sourire très longtemps. Mention spéciale à Alicia et Tiphaine qui sont venues de loin pour assister à la soutenance, votre présence m'a été très précieuse, merci.

#### **A ma famille, à mes parents,**

J'adresse pour finir un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenus dans mes choix et qui ont tout mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études. Merci pour toutes ces valeurs que vous m'avez transmises, pour votre soutien, vos encouragements et votre confiance en moi, vous êtes un exemple pour moi, je vous en serai toujours reconnaissante. Un énorme merci aussi à mon frère, Romain, même si on se voit peu je sais que tu n'es jamais loin. Je sais que je peux toujours compter sur vous.

Merci pour tout.

Je remercie

L'Université de Limoges



et la

La Région Limousin



qui m'a soutenu financièrement pendant la durée de cette Thèse en  
m'attribuant une bourse régionale

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : ETAT ACTUEL DU PROBLEME.....</b>	<b>4</b>
<b>I. CANCER DU SEIN ET TRAITEMENTS ACTUELS .....</b>	<b>4</b>
<b>I.1. La glande mammaire et sa cancérisation .....</b>	<b>4</b>
I.1.1. La glande mammaire : structure, évolution .....	4
I.1.2. Le cancer du sein .....	7
I.1.3. La carcinogenèse mammaire.....	12
I.1.4. La vascularisation de la tumeur mammaire .....	18
<b>I.2. Thérapies dans le cancer du sein .....</b>	<b>28</b>
I.2.1. Les chimiothérapies classiques.....	29
I.2.2. Les chimiothérapies ciblées .....	40
<b>I.3. Le cancer du sein chez l'animal de compagnie.....</b>	<b>51</b>
I.3.1. Intérêt de l'implication des animaux de compagnie dans la recherche contre le cancer du sein .....	51
I.3.2. Chez le chien ( <i>Canis Lupus familiaris</i> ) .....	52
I.3.3. Chez le chat ( <i>Felis silvestris catus</i> ) .....	54
<b>II. LES MODES DE LIBERATION PROLONGEE DES MOLECULES DE CHIMIOETHERAPIES .....</b>	<b>55</b>
<b>II.1. Les multiples possibilités de relargage prolongé du Paclitaxel .....</b>	<b>56</b>
<b>II.2. Formes galéniques du Paclitaxel les plus avancées dans leur développement.....</b>	<b>57</b>
II.2.1. Abraxane® .....	57
II.2.2. Prodrogue macromoléculaire : le Xyotax® .....	59
II.2.3. OncoGel™ .....	61
<b>II.3. Les hydrogels : outils de libération contrôlée de chimiothérapie.....</b>	<b>63</b>
II.3.1. Description/Définition des hydrogels .....	63
II.3.2. Hydrogels à base de polymères naturels .....	65
II.3.3. Hydrogels à base de polymères synthétiques .....	67
II.3.4. Biodégradabilité/Biocompatibilité.....	72
<b>III. OBJECTIFS DE CETTE ETUDE .....</b>	<b>75</b>
<b>PARTIE EXPERIMENTALE .....</b>	<b>76</b>
<b>PROJET N°1 : MODELE ANIMAL.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Problématique .....</b>	<b>78</b>
<b>2. Modèle issu de la greffe de cellules MDA-MB-231 .....</b>	<b>78</b>
2.1. Mise en œuvre du modèle MDA-MB-231 .....	78
2.2. Discussion des différentes tentatives de greffe du modèle MDA-MB-231 .....	80
<b>3. Modèle issu de la greffe de cellules Walker 256.....</b>	<b>81</b>
3.1. Mise au point de la greffe.....	81
3.2. Influence du nombre de cellules sur le développement tumoral.....	83
3.3. Influence du site d'injection sur le développement tumoral .....	84
3.4. Caractéristiques macroscopiques des tumeurs.....	85
3.5. Caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs.....	86
3.6. Discussion du modèle issu de la greffe de cellules Walker 256.....	91
<b>PROJET N°2 : CHOIX DES MOLECULES ANTICANCEREUSES.....</b>	<b>93</b>
<b>1. Problématique .....</b>	<b>94</b>
<b>2. Détermination des EC50 des différentes molécules .....</b>	<b>94</b>
2.1. EC50 des molécules cytotoxiques (Paclitaxel, Roscovitine et Acide Urocolique) .....	95
2.2. EC50 des molécules anti-angiogéniques (Fingolimod et Sutent®) .....	96
2.3. Discussion des valeurs d'EC50 des différentes molécules .....	97
<b>3. Combinaisons de chimiothérapies.....</b>	<b>99</b>
3.1. Combinaisons PTX/UA et PTX/Roscovitine .....	99
3.2. Combinaisons PTX/FTY et PTX/SU .....	99
3.3. Discussion concernant les différentes combinaisons .....	101
<b>PROJET N°3: DETERMINATION DU TYPE DE POLYMERE UTILISE .....</b>	<b>103</b>

1.	Problématique .....	104
2.	Etude du relargage du Paclitaxel .....	104
2.1.	Relation entre la quantité de polymère et le relargage du Paclitaxel.....	104
2.2.	Relation entre le ratio PEG/PLA et le relargage du Paclitaxel .....	108
2.3.	Corrélation entre le nombre d'actifs incorporés dans le polymère et leurs vitesses de relargage .	109
2.4.	Caractérisation microscopique du polymère P6R1.....	111
3.	Discussion sur le choix du polymère.....	112
<b>PROJET N°4 : EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA COMBINAISON PACLITAXEL/SUTENT®.....</b>		<b>114</b>
1.	Problématique .....	115
2.	Mesure de l'effet de la combinaison PTX/SU administrée par voie classique, sur la croissance tumorale de notre modèle animal .....	116
3.	Détermination de la dose optimale de PTX incorporé en polymère pour des essais <i>in vivo</i> .....	117
3.1.	Essai à 5, 25 et 50 mg de Paclitaxel dans le polymère .....	118
3.2.	Essai à 70 mg de Paclitaxel dans le polymère.....	Erreur ! Signet non défini.
3.3.	Discussion concernant les doses de PTX à injecter.....	119
4.	Détermination de la fréquence d'injection du polymère .....	120
5.	Evaluation de l'efficacité du traitement sur la croissance tumorale <i>in vivo</i> par la mesure du volume tumorale et par PET-Scan .....	121
5.1.	Evaluation de l'efficacité sur la croissance tumorale.....	121
5.2.	Evaluation de l'efficacité par imagerie médicale des animaux par la technique du PET SCAN .....	125
5.3.	Evaluation de la dissémination métastatique .....	127
5.4.	Effets indésirables des chimiothérapies.....	127
6.	Effets histologiques de la combinaison PTX+SU délivrée par hydrogel .....	128
6.1.	Effets sur l'apoptose cellulaire .....	128
6.2.	Effet sur la vascularisation .....	130
7.	Discussion générale de la combinaison entre le PTX et le SU <i>in vivo</i> .....	130
<b>PROJET N°5 : PHARMACOCINETIQUE <i>IN VIVO</i> .....</b>		<b>133</b>
1.	Problématique .....	134
2.	Libération <i>in vivo</i> du Paclitaxel.....	134
3.	Libération <i>in vivo</i> du Sutent® .....	135
4.	Discussion .....	135
<b>PROJET N°6 : TOXICITE CUTANEE DU POLYMERE.....</b>		<b>137</b>
1.	Problématique .....	138
2.	Toxicité cutanée du MedinGel™ seul et associé au Paclitaxel et Sutent® .....	138
2.1.	Evolution du site d'injection.....	138
2.2.	Phase aiguë de l'inflammation ou vasculo-exudative.....	139
2.3.	Phase cellulaire de l'inflammation.....	141
3.	Discussion .....	143
<b>PROJET N°7 : APPLICATION A D'AUTRES AGENTS ANTICANCEREUX.....</b>		<b>144</b>
1.	Problématique .....	145
2.	Combinaison Sutent® et Fingolimod .....	146
2.1.	Efficacité anti-angiogénique.....	146
2.2.	Efficacité antitumorale.....	148
3.	Discussion .....	152
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>		<b>155</b>
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>167</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>		<b>168</b>
<b>FICHES TECHNIQUES .....</b>		<b>183</b>
<b>PUBLICATIONS ACCEPTEES OU SOUMISES.....</b>		<b>199</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : COUPE ANATOMIQUE SIMPLIFIEE ET SCHEMATIQUE D'UN SEIN. . . . .	4
FIGURE 2 : EVOLUTION DE LA STRUCTURE DES CANAUX GALACTOPHORES CHEZ LA SOURIS.. . . .	6
FIGURE 3 : SURVIE AU CANCER DU SEIN APRES CINQ, DIX, QUINZE ET VINGT ANS EN FONCTION DE L'AGE AU MOMENT DU DIAGNOSTIC POUR LES FEMMES HABITANTS LE ROYAUME-UNI.....	7
FIGURE 4 : DIFFERENTES ETAPES DE LA PROGRESSION METASTATIQUE. ....	17
FIGURE 5 : STRUCTURE DE LA PAROI VASCULAIRE. ....	18
FIGURE 6: ARCHITECTURE DES VAISSEAUX NORMAUX ET TUMORAUX. ....	20
FIGURE 7 : IMPLICATION DES CELLULES TUMORALES DANS LA VASCULOGENESE TUMORALE. <sup>8</sup> . . . . .	21
FIGURE 8 : PERMEABILITE ACCRUE DES VAISSEAUX INTRA-TUMORAUX ET FORMATION DE LITS VASCULAIRES.. . . .	22
FIGURE 9 : ROLE DE L'ANGIOGENESE A DIFFERENTES ETAPES DU DEVELOPPEMENT TUMORAL. SOURCE <sup>49</sup> . . . . .	23
FIGURE 10 : DIFFERENTES ETAPES DE L'ANGIOGENESE TUMORALE.. . . .	26
FIGURE 11 : STRUCTURES CHIMIQUES DU PACLITAXEL (A) ET DE SON EXCIPIENT LE CREMOPHOR (B). . . . .	32
FIGURE 12 : POLYMERISATION DES MICROTUBULES.. . . .	33
FIGURE 13 : DYNAMIQUE DES MICROTUBULES. SOURCE <sup>67</sup> . . . . .	34
FIGURE 14 : ACTION DU PACLITAXEL, VINBLASTINE ET VINCRISTINE SUR LES MICROTUBULES.. . . .	35
FIGURE 15 : MECANISMES DE RESISTANCE AUX AGENTS SE LIANT A LA TUBULINE.....	37
FIGURE 16 : VOIES DE SIGNALISATION : CIBLES POTENTIELLES DANS LE CADRE DE LA THERAPIE DU CANCER DU SEIN. ....	42
FIGURE 17 : LA FAMILLE DES RECEPTEURS HER. C . . . . .	43
FIGURE 18 : LES TROIS MECANISMES DES INHIBITEURS DE L'ANGIOGENESE CIBLANT LE VEGF ACTUELLEMENT APPROUVES PAR LA FDA. ....	48
FIGURE 19 : PROPRIETES DU SUNITINIB MALATE.....	50
FIGURE 20 : POSSIBILITE DE RECHERCHE TRANSLATIONNELLE, INTERET DE LA THERAPIE VETERINAIRE POUR LA THERAPIE HUMAINE....	52
FIGURE 21 : CONCENTRATIONS PLASMATIQUES DE PACLITAXEL CONJUGUE AU XYOTAX <sup>®</sup> ET LIBRE APRES UNE ADMINISTRATION CHEZ QUATRE PATIENTS REPRESENTATIFS DES GROUPES. ....	60
FIGURE 22 : ENSEMBLE DES PUBLICATIONS RELATIVES AUX HYDROGELS CES 15 DERNIERES ANNEES.. . . .	64
FIGURE 23 : SQUELETTE D'UN POLYMERE COMPOSE DE PLA.....	68
FIGURE 24 : CYCLE DE VIE DU PLA. LE PLA EST UN POLYMERE TOTALEMENT BIODEGRADABLE ET BIOCOMPATIBLE. . . . .	68
FIGURE 25 : STRUCTURE DU COPOLYMERE PLA/PEG.....	71
FIGURE 26 : PRINCIPE D'UTILISATION DU MEDINGEL <sup>™</sup> . . . . .	71
FIGURE 27 : IMPACT DES DIFFERENTS TRAITEMENTS IMMUNOSUPPRESSEURS SUR LE POIDS DES RATES. ....	79
FIGURE 28 : CROISSANCE TUMORALE APRES L'INJECTION DE 10 <sup>7</sup> CELLULES DE LA LIGNEE WALKER 256. ....	82
FIGURE 29 : EXPLORATION D'UNE RATE AU PET-SCAN. ....	82
FIGURE 30 : INFLUENCE DU NOMBRE DE CELLULES WALKER 256 INJECTEES SUR LA CROISSANCE TUMORALE. ....	83
FIGURE 31 : INFLUENCE DU SITE D'INJECTION SUR LA PRISE DE GREFFE.....	84
FIGURE 32 : ASPECT MACROSCOPIQUE EXTERNE D'UNE TUMEUR WALKER 256.....	85
FIGURE 33 : COUPE DE TUMEUR, APRES EXCISION. ....	86
FIGURE 34 : TUMEUR ORTHOTOPIQUE INFILTRANT LA GLANDE MAMMAIRE.. . . .	87
FIGURE 35 : INFILTRATION D'UNE TUMEUR ECTOPIQUE.. . . .	88
FIGURE 36 : PLAGE DE NECROSE CENTRALE. ....	88
FIGURE 37 : VASCULARISATION D'UNE TUMEUR ORTHOTOPIQUE. ....	89
FIGURE 38 : VASCULARISATION INTRA-TUMORALE.. . . .	90
FIGURE 39: DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EFFICACES 50 (EC50) DES MOLECULES CYTOTOXIQUES SUR LA LIGNEE WALKER 256 A 48 H ET 72 H.....	95
FIGURE 40: DETERMINATION DES CONCENTRATIONS EFFICACES 50 (EC50) DES MOLECULES ANTI-ANGIOGENIQUES SUR LA LIGNEE WALKER 256 A 48 H ET 72 H.. . . .	97
FIGURE 41 : ACTIVITE ANTI-PROLIFERATIVE DU PACLITAXEL SEUL ET COMBINE A L'ACIDE URSOLIQUE (UA) OU A LA ROSCOVITINE (Rosc). (A). . . . .	99
FIGURE 42 : ACTIVITE ANTI-PROLIFERATIVE DU PACLITAXEL SEUL ET COMBINE AU FINGOLIMOD ET AU SUTENT <sup>®</sup> . . . . .	100
FIGURE 43 : EFFET DU PACLITAXEL ET DU SUTENT <sup>®</sup> SEUL ET EN COMBINAISON SUR LA CAPACITE MIGRATOIRE DES CELLULES . . . . .	100
FIGURE 44 : DIFFERENTES COMPOSITIONS DES POLYMERES UTILISEES. EXPRIMEE EN POURCENTAGE DE LA MASSE TOTALE. ....	105
FIGURE 45 : CORRELATION ENTRE LA QUANTITE DE POLYMERE P6R1 ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL.. . . .	106
FIGURE 46 : CORRELATION ENTRE LA QUANTITE DE POLYMERE P6R2.2 ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL. ....	107
FIGURE 47 : CORRELATION ENTRE LA QUANTITE DE POLYMERE P6R2.6 ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL.. . . .	107

FIGURE 48 : CORRELATION ENTRE LA QUANTITE DE POLYMERE P6R4 ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL.....	108
FIGURE 49 : RELATION ENTRE LE RATIO PEG/PLA DU POLYMERE ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL. L .....	109
FIGURE 50 : CORRELATION ENTRE L'ADJONCTION DU SUTENT® DANS LE POLYMERE ET LE RELARGAGE DU PACLITAXEL. ....	110
FIGURE 51 : CORRELATION ENTRE L'ADJONCTION DU PACLITAXEL DANS LE POLYMERE ET LE RELARGAGE DU SUTENT®. ....	110
FIGURE 52 : STRUCTURE DU POLYMERE CHARGE AVEC LES DIFFERENTES MOLECULES.....	111
FIGURE 53 : CROISSANCE Tumorale APRES TRAITEMENTS PAR LE PACLITAXEL, LE SUTENT® ET LA COMBINAISON ADMINISTRES PAR VOIE CLASSIQUE. ....	117
FIGURE 54 : INFLUENCE DE LA QUANTITE DE PACLITAXEL INCORPOREE AU POLYMERE.....	118
FIGURE 55 : EVALUATION DE L'INTERET DE DEUX INJECTIONS DE POLYMERES SUR LE CONTROLE TUMORAL.....	120
FIGURE 56 : CROISSANCE Tumorale APRES TRAITEMENTS PAR LE PACLITAXEL ET/OU LE SUTENT® RELARGUES PAR HYDROGELS. ...	122
FIGURE 57 : OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES TUMEURS PROVENANT DES GROUPES TRAITES AVEC LES CHIMIOThERAPIES PIEGEES DANS LE MEDINGEL™. ....	124
FIGURE 58 : EXPLORATION DES RATES PAR IMAGERIE MEDICALE, 4 JOURS APRES LE DEBUT DU TRAITEMENT.....	125
FIGURE 59 : RAT TRAITÉ AVEC DU TAXOL® VS RAT TRAITÉ AVEC DU PACLITAXEL INCORPORE EN HYDROGEL (PTX-P).. ....	128
FIGURE 60 : EFFET DES DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR L'APoptOSE CELLULAIRE.....	129
FIGURE 61 : APoptOSE CELLULAIRE EN FONCTION DES DIFFERENTS TRAITEMENTS EN HYDROGEL. ....	129
FIGURE 62 : DENSITE VASculaire DES TUMEURS DES DIFFERENTS GROUPES.. ....	130
FIGURE 63 : EVOLUTION DU SITE D'INJECTION DU POLYMERE.....	139
FIGURE 64 : CONGESTION DES VAISSEaux SANGUINS SUITE A L'INJECTION DU POLYMERE. E. ....	140
FIGURE 65 : ŒDEME INFLAMMATOIRE SUITE A L'INJECTION DE POLYMERE. ....	141
FIGURE 66 : DIAPeDESE LEUCOCYTAIRE SUITE A L'INJECTION DU POLYMERE. ....	141
FIGURE 67 : VUE GLOBALE DU SITE DE LA REACTION INFLAMMATOIRE 24 H APRES L'INJECTION DE POLYMERE. ....	142
FIGURE 68 : EVOLUTION DES CELLULES IMMUNITAIRES AU SEIN DU GRANULOME.. ....	142
FIGURE 69 : INHIBITION DU RECRUTEMENT DES CMLs PAR LES CELLULES ENDOTHELIALES ET TumorALES. ....	146
FIGURE 70 : INHIBITION DE LA CROISSANCE ET DE L'ORGANISATION SPATIALES DES CMLs DANS LE BLANC D'ŒUF.....	148
FIGURE 71 : EFFET DE LA COMBINAISON SUTENT® ET FINGOLIMOD EN PREVENTION DU DEVELOPPEMENT TUMORAL, <i>IN VIVO</i> . ....	149
FIGURE 72 : EFFET DE LA COMBINAISON SUTENT® ET FINGOLIMOD SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL <i>IN VIVO</i> . ....	150
FIGURE 73 : ANALYSE HISTOLOGIQUE DES VAISSEaux INTRA-TUMORAUX.....	151
FIGURE 74 : DENSITE VASculaire INTRA-TUMORALE.....	152
FIGURE 76: ZONE D'INJECTION .....	188
FIGURE 77 : SPECTRE D'ABSORPTION UV DU PACLITAXEL. LE MAXIMUM D'ABSORPTION EST RETROUVE A 230NM.....	188
FIGURE 78 : COURBE D'ETALONNAGE DU PACLITAXEL POUR SON DOSAGE EN HPLC-UV.....	189

## LISTE DES TABLES

TABLE 1 : CLASSIFICATION TNM SIMPLIFIÉE. ADAPTÉE DE «REVISION OF THE AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER STAGING SYSTEM FOR BREAST CANCER».	10
TABLE 2 : CLASSIFICATION DES STADES DU CANCER DU SEIN. BASEE SUR LES DIFFERENTS SCORES OBTENUS AVEC LA CLASSIFICATION TNM.	10
TABLE 3 : LES DIFFERENTES CLASSES D'AGENTS ANTICANCEREUX INDIQUES DANS LE CANCER DU SEIN ET CLASSES PAR LEUR MODE D'ACTION.	30
TABLE 4 : EXEMPLES DE MOLECULES NECESSITANT LE CREMOPHOR-EL POUR LEUR SOLUBILISATION.	39
TABLE 5 : DIFFERENTES STRATEGIES D'HORMONOTHERAPIES UTILISEES POUR LE TRAITEMENT DU CANCER DU SEIN.	27
TABLE 6 : NOUVELLES THERAPEUTIQUES CIBLANT HER2.	45
TABLE 7 : PRINCIPAUX FACTEURS PARTICIPANT A L'ANGIOGENESE.	47
TABLE 8 : CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DES TUMEURS MAMMAIRES CANINES.	53
TABLE 9 : NOUVELLES FORMES GALENIQUES, NON EXHAUSTIVES, DU PACLITAXEL ET LEURS AVANCEES EN CLINIQUE.	56
TABLE 10 : POLYMERES NATURELS PREFORMES UTILISES POUR LA SYNTHESE D'HYDROGEL.	66
TABLE 11 : POLYMERES SYNTHETIQUES PREFORMES UTILISES POUR LA SYNTHESE D'HYDROGELS.	67
TABLE 12 : VALEURS D'EC50 DE DIFFERENTES MOLECULES ANTICANCEREUSES, SUR LA LIGNEE WALKER 256.	97
TABLE 13 : COMPARAISON ENTRE LA BUPRENORPHINE ET LE PACLITAXEL.	104
TABLE 14 : RECAPITULATIF DES DONNEES DE L'EFFET DES TRAITEMENTS ADMINISTRES DE MANIERE SYSTEMIQUE.	117
TABLE 15: RECAPITULATIF DES DONNEES DE L'EFFET DES TRAITEMENTS INCORPORES EN POLYMERE.	122
TABLE 16 : VALEURS QUALITATIVE OBTENUES APRES LES PET-SCANS DES ANIMAUX	126
TABLE 17 : DISSEMINATION METASTASIQUE EN FONCTION DES TRAITEMENTS.	127
TABLE 18 : RELARGAGE <i>IN VIVO</i> DU PACLITAXEL. DOSAGES REALISES PAR LA METHODE D'HPLC-UV APRES UNE EXTRACTION SUR MINI-COLONNES.	134
TABLE 19 : RELARGAGE <i>IN VIVO</i> DU SUTENT®.	135
TABLE 1 : PRINCIPES ACTIFS AVEC UN INTERET EN RELARGAGE LOCAL	163
TABLE 20 : FORMULATION DES POLYMERES POUR UN INJECTAT DE 200 MG	186

## LISTE DES FICHES TECHNIQUES

FICHE TECHNIQUE N°2 : CULTURE DES CELLULES FLOTTANTES WALKER 256 .....	186
FICHE TECHNIQUE N°3 : COMPTAGE CELLULAIRE .....	187
FICHE TECHNIQUE N°4 : INDUCTION D'UNE TUMEUR MAMMAIRE HUMAINE ORTHOTOPIQUE CHEZ LE RAT IMMUNOCOMPETENT ....	188
FICHE TECHNIQUE N°5 : INDUCTION D'UNE TUMEUR MAMMAIRE SYNGENIQUE ORTHOTOPIQUE CHEZ LE RAT IMMUNOCOMPETENT	189
FICHE TECHNIQUE N°6 : SUIVI DES ANIMAUX .....	190
FICHE TECHNIQUE N°7 : EUTHANASIE ET AUTOPSIE DES ANIMAUX .....	191
FICHE TECHNIQUE N°8 : REALISATION DE COUPES HISTOLOGIQUES .....	192
FICHE TECHNIQUE N°9 : MARQUAGES DES COUPES HISTOLOGIQUES .....	193
FICHE TECHNIQUE N°10 : TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE .....	183
FICHE TECHNIQUE N°11: TEST DE MIGRATION CELLULAIRE .....	184
FICHE TECHNIQUE N°12 :FORMULATION DES POLYMERES .....	186
FICHE TECHNIQUE N°13 : CINETIQUE DE RELARGAGE <i>IN VITRO</i> DES POLYMERES .....	187
FICHE TECHNIQUE N°14 : DOSAGE DU PACLITAXEL PAR HPLC-UV .....	188
FICHE TECHNIQUE N°15 : DOSAGE DU SUTENT <sup>®</sup> PAR HPLC/MS-MS .....	190
FICHE TECHNIQUE N°16 : PRELEVEMENTS SANGUINS PAR PONCTION CARDIAQUE .....	192
FICHE TECHNIQUE N°17 : IMAGERIE MEDICALE : TOMOSCINTIGRAPHIE AU <sup>18</sup> FDG .....	193
FICHE TECHNIQUE N°18 : TEST DE TOXICITE CUTANEE DU MEDINGEL™ .....	194
FICHE TECHNIQUE N°19 : LE BLANC D'ŒUF COMME MATRICE DE CULTURE EN 3D .....	196
FICHE TECHNIQUE N°20 : CULTURE DE CELLULES PRIMAIRES VASCULAIRES .....	197

## Liste des abréviations

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination

ADN : Acide Désoxyribonucléotide

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ARN : Acide Ribonucléotide

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

BMS : Bristol Myers Squibb

Cdk : Kinase cycline-dépendante

CE : Cellules Endothéliales

CML : Cellule Musculaire Lisse

CrEI : Cremophor-El

CSF : Colony Stimulating Factor

CyA : Cyclosporine A

EGF : Epithelial Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMA : European Medicines Agency

FDA : Food and Drug Administration

FGF : Fibroblast Growth Factor

FLT3 : Fms-related tyrosine kinase

FTY : Fingolimod

GDP : Guanosine Diphosphate

Gp60 : Glycoprotéine de 60 kDa

GPCR : Récepteurs couplés aux protéines G

GTP : Guanosine Triphosphate

HEMA : Hydroxyéthyl de Méthacrylate

HER : Human Epidermal Growth Factor receptor

HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor-1

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

IGF : Insulin Growth Factor

IV : Intraveineuse

KRT : Kris Ringer TRIS

LOH : Loss Of Heterozygosity

MAP : Protéines Associées aux Microtubules

MDR : Multi Drug Resistant

MEC : Matrice Extracellulaire

MMP : Métalloprotéases matricielles

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin

NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor- $\kappa$ B

PBS : Phosphate Buffer Saline

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDLLA : Acide poly-DL-lactique

PEG : Polyéthylène glycol

PLA : Acide Polylactique

PLGA : Acide polylactique-co-glycolique  
PPG : Polypropylène glycol  
PTX : Paclitaxel  
RECIST : Response Evaluation Criteria in Solid Tumors  
ROS : Reactive  
SPARC : Secreted Protein Acid Rich in Cysteine  
SU : Sunitinib, Sutent®  
TGF : Tumor Growth Factor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand  
UA : Acide Ursolique  
UCC : Union Contre le Cancer  
uPA : Activateur du plasminogène  
VE : Vascular Endothelial  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

# INTRODUCTION

# INTRODUCTION

---

L'incidence des cancers n'a cessé d'augmenter ces dernières années, obligeant à trouver de nouveaux moyens thérapeutiques. La recherche contre le cancer a même réussi à mobiliser les instances politiques françaises, ce qui a abouti à la création d'un organisme de recherche dédié à cette cause, l'Institut National du Cancer ou INCa.

Il faut noter également que, si l'incidence des cancers a augmenté, le nombre de molécules de chimiothérapie anticancéreuse a, lui aussi, augmenté, en particulier avec des molécules de thérapie dite ciblée (anticorps monoclonaux, inhibiteurs des tyrosine-kinases) et des molécules anti-angiogéniques. Cependant, parmi les molécules disponibles aujourd'hui que ce soit les anciennes molécules ou les plus récentes, beaucoup ont du mal à trouver des formulations galéniques adaptées aux patients et certaines pourraient être plus efficaces si elles étaient délivrées directement dans les sites tumoraux primaires ou métastatiques, et non par voie systémique (IV ou per os). C'est la raison pour laquelle la formulation de chimiothérapies à libération locale a retenu notre attention.

Notre équipe de recherche, l'EA 4021, intitulée "Biomolécules et Thérapies Antitumorales", avait une collaboration avec l'équipe du CRBA dirigée par M. Michel Vert (Centre de Recherche des Biopolymères Artificiels) et la société MedinCell située à Montpellier, sur la libération d'antibiotiques par biopolymères résorbables. Il nous a paru intéressant pour compléter cette collaboration, de tester la possibilité d'insérer des molécules anticancéreuses dans ces polymères et secondairement, d'en tester l'efficacité *in vivo* sur un modèle animal.

Notre attention s'est portée dans un premier temps sur le Paclitaxel (PTX) car c'est une molécule très utilisée en oncologie mais dont la formulation galénique commerciale présente de nombreux défauts (hydrophobie, toxicité de l'excipient, longueur du temps de perfusion...). De plus, plusieurs tentatives d'amélioration de cette galénique existaient, justifiant ainsi la logique de cette démarche. Coupler cette molécule de chimiothérapie classique à une molécule de mode d'action différent présenterait un intérêt thérapeutique pour le patient. En effet, la combinaison thérapeutique semble être la voie la plus prometteuse dans le traitement contre le cancer.

Pour tester le Paclitaxel reformulé avec un hydrogel, il nous fallait utiliser un modèle animal qui reproduisait une pathologie humaine et qui soit sensible à cette molécule. C'est la raison pour laquelle un modèle de cancer du sein ayant une croissance chez le rat immunocompétent a été choisi (modèle Walker 256).

La thèse présentée est donc scindée en 3 grandes parties. Dans une première Partie intitulée "Etat actuel du problème", la pathologie du cancer du sein et les thérapies actuelles seront décrites, ainsi que les polymères utilisés en clinique et les anticancéreux qui ont été utilisés (PTX, SU). Puis, dans la Partie Expérimentale, les résultats seront rapportés sous la forme de "Projets" ayant leur cohérence interne avec une discussion à la fin de chaque Projet. Enfin dans la Partie Discussion et perspectives, les résultats obtenus seront comparés à ceux des autres équipes de recherche et nous tenterons de dégager des perspectives pour le futur de ce travail.

**PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :**

**ÉTAT ACTUEL DU**

**PROBLEME**

# PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE : ÉTAT ACTUEL DU PROBLEME

---

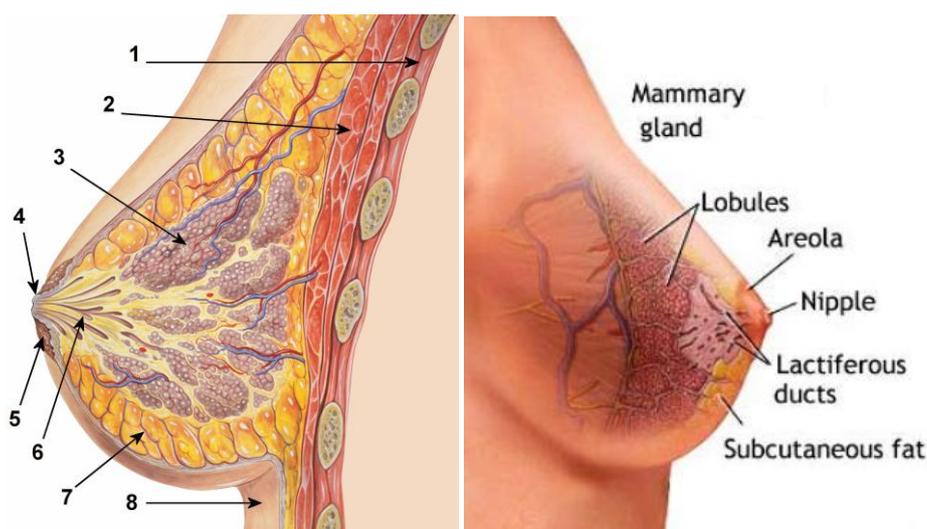
Le cancer du sein, malgré les progrès scientifiques, reste un problème de santé publique. La recherche de nouvelles thérapeutiques innovantes est plus que jamais d'actualité. Après avoir décrit cette maladie, nous aborderons la situation actuelle ainsi que les thérapeutiques utilisées en cliniques, puis nous nous projeterons dans le développement de nouvelles méthodes d'administrations de traitements.

## I. CANCER DU SEIN ET TRAITEMENTS ACTUELS

### I.1. La glande mammaire et sa cancérisation

#### I.1.1. La glande mammaire : structure, évolution

Le sein est une glande exocrine qui produit le lait maternel après la grossesse, et qui se développe tout au long de la vie de la femme. Elle est aussi par certains aspects une glande endocrine qui synthétise des hormones pour son propre usage. La glande mammaire est incluse dans le tissu adipeux sous-cutané et rattachée par ses canaux excréteurs (Figure 1).

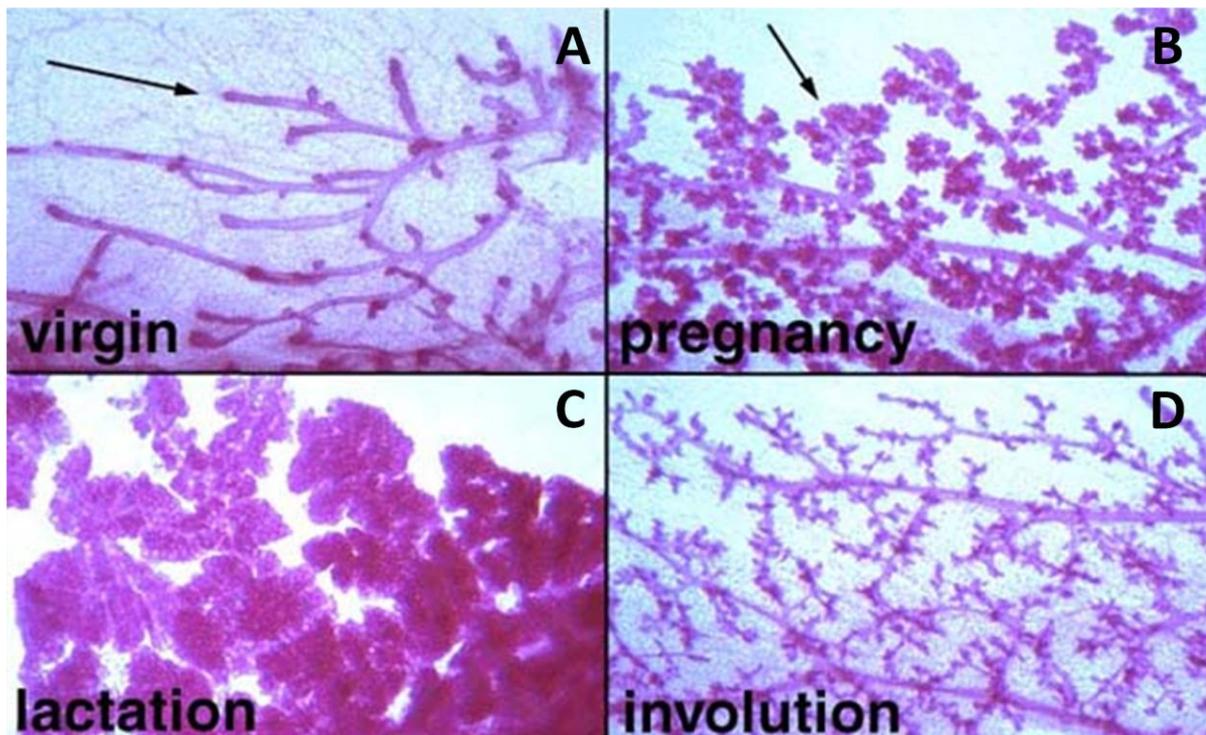


**Figure 1 : Coupe anatomique simplifiée et schématique d'un sein.** 1 : Cage thoracique, 2 : Muscles Pectoraux, 3 : Lobule, 4 : Mamelon, 5 : Aréole, 6 : Conduit galactophore, 7 : Tissu Adipeux, 8 : Peau. Source<sup>1</sup>.

La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, perfusé par les vaisseaux sanguins et les nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes<sup>2</sup>. Une coopération permanente existe entre ces deux compartiments au cours du développement de la glande mammaire. Cette architecture se construit du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence principale des œstrogènes et de la progestérone. L'action de ces hormones se fait à la fois de manière directe en agissant sur les cellules épithéliales, et indirecte sur les cellules mésenchymateuses qui sécrètent alors des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epithelial Growth Factor), le TGF- $\alpha$  (Tumor Growth Factor), le TGF- $\beta$ , l'IGF (Insulin Growth Factor) et le FGF (Fibroblast Growth Factor). Ces facteurs de croissance sont des régulateurs de la prolifération et de la différenciation normale de l'épithélium mammaire à l'exception du TGF- $\beta$  qui est inhibiteur de la croissance cellulaire. Les œstrogènes possèdent une action indirecte sur la prolifération des cellules favorisant leur prolifération et leur migration par l'intermédiaire de la synthèse des protéases qui permettront la dégradation de la matrice extracellulaire locale<sup>3,4</sup>.

Au cours de la vie fœtale, et plus particulièrement lors du troisième trimestre de la grossesse, la mère produit des œstrogènes et de la progestérone qui provoquent chez le fœtus une canalisation de l'épithélium mammaire, une différenciation du parenchyme mammaire, la formation des canaux galactophores, ainsi que le développement du réseau lobulo-alvéolaire. Après la naissance, la glande reste dans cet état rudimentaire jusqu'à la puberté où les premières modifications ovariennes apparaissent, avec la mise en place des cycles menstruels. La glande mammaire est alors soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes seuls (1<sup>ère</sup> moitié du cycle) et aux œstrogènes plus progestérone (2<sup>ème</sup> moitié du cycle). Au cours de la phase folliculaire (1<sup>ère</sup> moitié du cycle), la production d'œstrogènes est associée à une prolifération de l'épithélium canalaire. Pendant la seconde moitié du cycle (la phase lutéale), l'augmentation de la progestérone provoque la dilatation des canaux et une différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétoires<sup>5,6</sup> (Figure 2-A). En l'absence de grossesse, la glande reste dans cet état jusqu'au cycle suivant. Au cours de la grossesse, sous l'influence des œstrogènes, de la progestérone et de facteurs de croissance tels que le TGF- $\alpha$ , les ramifications terminales des canaux se multiplient (développement de

l'appareil sécrétoire) et de nombreuses alvéoles se développent (Figure 2-B). En fin de grossesse et tout au long de la lactation, les alvéoles produisent du lait qui sera acheminé jusqu'au mamelon via les canaux galactophores (Figure 2-C). Les alvéoles régressent lors du sevrage et la glande revient à son état initial. Lors de la ménopause, le déclin des fonctions ovariennes provoque une régression des structures de la glande mammaire ; les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge<sup>7-10</sup> (Figure 2-D).



**Figure 2 : Evolution de la structure des canaux galactophores chez la souris.** Les images représentent l'état de la glande mammaire chez la souris prépuberte (A), au cours de la gestation (B), la lactation (C), la ménopause (D). Les photographies sont extraites de *Biology of the mammary gland*. Source<sup>11</sup>.

Ainsi, sous l'influence des hormones et des facteurs de croissance, la glande mammaire est en évolution permanente. Tous ces remaniements nécessitent de nombreuses mitoses, le risque d'erreur au cours de la réplication de l'ADN est donc augmenté par rapport à un organe stable. La glande mammaire représente une cible privilégiée pour les transformations malignes<sup>12</sup>.

## I.1.2. Le cancer du sein

### I.1.2.1. Epidémiologie

Le cancer du sein est le carcinome féminin le plus répandu et la deuxième cause de mortalité chez la femme. En Europe, plus de 421 000 nouveaux cas surviennent chaque année, ce qui représente 13% des cancers totaux et 30% des cancers de la femme<sup>13</sup>. Le cancer du sein est responsable de plus de 89 000 décès de femmes par an en Europe. De 1980 à 2005, l'incidence du cancer du sein a augmenté de 74 %, soit une hausse annuelle de 2,4 %, alors que depuis 1998, le taux de mortalité diminue de 1,3 % par an. Le vieillissement de la population, les nouveaux modes de vie (grossesses plus tardives, obésité et alcool plus courants chez la femme depuis quelques décennies), ainsi que la mise en place du dépistage du cancer du sein contribuent à l'augmentation de cette incidence, alors que ce même dépistage, combiné à l'amélioration des stratégies thérapeutiques, permettent la diminution de la mortalité<sup>14,15</sup>. Les taux globaux de survie relative, dépendent de l'âge du diagnostic et du type de cancer (Figure 3). Toutes classes d'âge confondues, la survie à un cancer du sein est de 75% à 5 ans, 70% à 10 ans, et de 60% à 20 ans<sup>16</sup>.

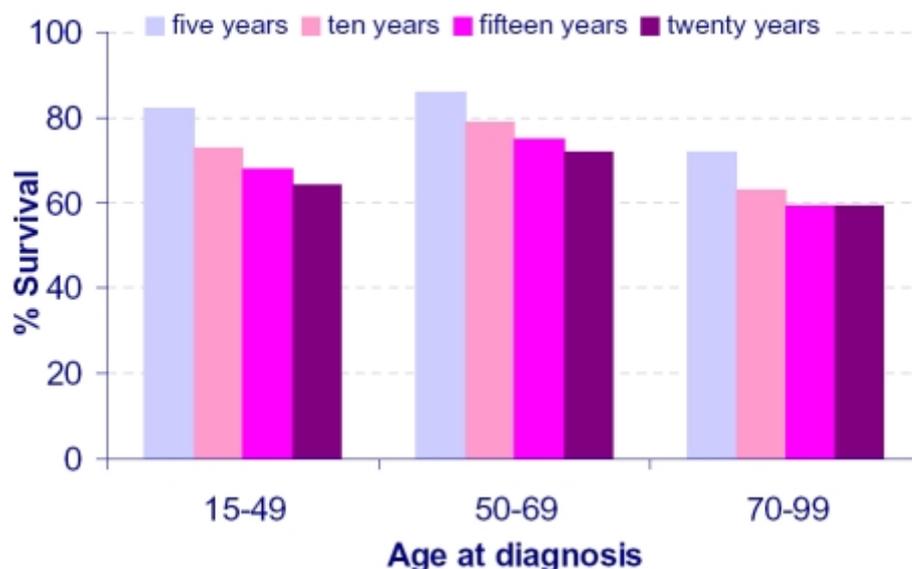


Figure 3 : Survie au cancer du sein après cinq, dix, quinze et vingt ans en fonction de l'âge au moment du diagnostic pour les femmes habitant le Royaume-Uni. Source<sup>16</sup>.

### 1.1.2.2. Les différents types de tumeurs mammaires

La très grande majorité des tumeurs malignes (> 95%) sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire des tumeurs développées à partir de l'épithélium glandulaire, soit à partir des canaux (carcinome canalaire), soit à partir des cellules des lobules glandulaires (cancer lobulaire).

Les **carcinomes dits *in situ*** (non infiltrants), sont constitués de cellules malignes mais avec absence d'envahissement des tissus voisins et un respect de la lame basale. On parle d'adénocarcinome intra-canalaire lorsque les cellules malignes sont confinées aux canaux galactophores. De la même manière, on parle alors d'adénocarcinome intra-lobulaire si les cellules sont confinées aux lobules.

Les **carcinomes sont dits infiltrants** quand les cellules ont détruit la membrane basale et infiltrent le tissu adjacent. Ces carcinomes se répartissent en trois principaux types : canalaire invasif, lobulaire invasif, et tubulaire invasif qui représentent respectivement 85, 4 et 5% de cette catégorie.

- Les carcinomes canauxiaux invasifs ont un aspect histologique très varié, les cellules tumorales se disposent en lobules, en travées ou encore forment des tubes. Le stroma, d'abondance variable, est fibreux, plus ou moins hyalinisé et peut être le siège de remaniements (inflammation, micro calcifications...).
- Les carcinomes lobulaires invasifs sont en général des tumeurs mal limitées et difficilement mesurable. La recherche du récepteur aux œstrogènes pour ce type de tumeur est positive dans 90% des cas, alors qu'elle ne l'est que dans 55 % des cas pour les autres carcinomes mammaires invasifs.
- Les carcinomes tubulaires invasifs représentent une variété de carcinome très différencié, dont les cellules sont régulières et disposées en tubules. Le pronostic est habituellement favorable<sup>17</sup>.

Le système de classification des cancers du sein est en constante évolution. Cette classification basée sur la morphologie des tumeurs (la classification TNM commune aux différents cancers solides) a évolué vers un système de classification moléculaire associé à l'expression de marqueurs protéiques.

#### I.1.2.2.1. Le portrait classique du cancer du sein

Le portrait dit « classique » du cancer du sein correspond à l'association de la classification TNM, du type histologique, de facteurs histologiques et d'un certain nombre de marqueurs. Le système de classification TNM a été établi en 1987 par l'union contre le cancer (UCC) et révisé en 2002. La classification T (Taille de la tumeur, T0-T4), N (« Node » : envahissement ganglionnaire, N0-N3), M (présence de Métastase : M0-M1), clinique et anatomopathologique (pTNM), permet une première évaluation pronostique basée sur l'extension de la tumeur au moment de la chirurgie (Table 1). Plus le cancer est à un stade avancé, plus les chiffres associés aux différents critères sont élevés. La classification histologique divise les tumeurs en tumeurs non infiltrantes (carcinome canalaire *in situ* et carcinome lobulaire *in situ*) et en tumeurs infiltrantes à potentiel métastatique<sup>18</sup>. Les différents stades sont résumés dans la Table 2.

Tumeur primitive (T)	
Tx	Détermination de la tumeur primitive impossible
T0	Pas de signe de tumeur primitive (non palpable)
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : Carcinome intra-canalair, ou carcinome lobulaire <i>in situ</i> , ou maladie de Paget du mamelon sans tumeur détectable.
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur > 2 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 5 cm dans sa plus grande dimension
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (a) ou à la peau (b). A noter : la paroi thoracique comprend les côtes, les muscles intercostaux et le grand dentelé, mais ne comprend pas le muscle pectoral
Adénopathies régionales (N)	
Nx	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire (du fait, par exemple, d'une exérèse antérieure)
N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
N1	Ganglions axillaires homolatéraux suspects qui restent mobiles
N2	Ganglions axillaires homolatéraux suspects fixés entre eux ou à d'autres structures, <b>ou</b> ganglions mammaires internes homolatéraux suspects, en l'absence de ganglions axillaires suspects
N3	Ganglions sous-claviculaires homolatéraux suspects ou ganglions mammaires internes avec présence d'adénopathies axillaires ou ganglions sus-claviculaires présents (avec ou sans la présence de ganglions axillaires ou mammaires internes)
Métastases (M)	
Mx	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

**Table 1 : Classification TNM simplifiée.** Adaptée de «Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer». Source<sup>19</sup>.

Sur cette base de classification TNM, une seconde classification décrit 5 stades, correspondant à une combinaison des facteurs T, N et M (Table 2).

Stade 0	Cancer <i>in situ</i> (non invasif)
Stade 1	La tumeur mesure au plus 2 cm et il n'y a pas de propagation à l'extérieur du sein
Stade 2	La tumeur mesure 2 à 5 cm et/ou il y a une atteinte ganglionnaire mineure
Stade 3	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire majeure
Stade 4	Tumeur avancée localement et/ou métastases à distance

**Table 2 : Classification des stades du cancer du sein.** Basée sur les différents scores obtenus avec la classification TNM. Source<sup>19</sup>.

#### I.1.2.2.2. Le portrait moléculaire

Grâce à l'émergence des techniques d'analyses à grande échelle telles que les puces à ADN, une classification moléculaire des cancers du sein a pu être générée. Initialement les données issues de ces puces à ADN étaient utilisées pour décrire les différences d'expression génique entre le tissu tumoral mammaire et le tissu mammaire sain. A partir des profils d'expression de plusieurs centaines de gènes, elles ont servi à classer, corrélérer et prédire l'évolution des cancers du sein<sup>20-22</sup>. Les cinq sous-types observés et cités ci-dessous ont été décrits comme étant des entités biologiques différentes les unes des autres<sup>23,24</sup>. Ils permettraient ainsi d'affiner la classification des cancers du sein et d'adopter des stratégies thérapeutiques spécifiques<sup>25,26</sup>.

Les cinq sous-groupes proposés récemment sont les suivants :

- « **Luminal** » : Il est le sous-type le plus représenté. Il est associé à des cancers généralement de bas grade et exprimant les récepteurs hormonaux. Il est subdivisé en deux groupes :
  - o **Luminal A** : de bon pronostic et de faible grade
  - o **Luminal B** : tumeurs moins différenciées que les A et plus prolifératives. Ils sont de grade plus élevé et de pronostic moins favorable expliquant les différences de réponses aux traitements hormonaux.
- « **Basal-like** » : les tumeurs entrant dans cette catégorie n'expriment ni les récepteurs hormonaux (récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone), ni le récepteur HER2. En revanche, elles expriment fortement les gènes de prolifération et ceux des cytokératines CK 5/6/17 et sont associées à une mutation de p53 dans 82% des cas. C'est dans ce groupe que la mutation BCRA1 est retrouvée la plupart du temps. Ces carcinomes sont de grade III et de mauvais pronostic.
- « **Her2** » : les carcinomes de ce groupe surexpriment le gène *HER2*, ce qui représente environ 25 à 30% des cancers du sein<sup>27,28</sup>. La plupart d'entre eux n'expriment pas les récepteurs hormonaux et la mutation de p53 est retrouvée dans 71% des cas. Ils sont de grade III. Les cancers du sein surexprimant le récepteur HER2 étaient considérés de mauvais pronostic. Cependant, ils illustrent parfaitement l'intérêt de la classification moléculaire des cancers du sein, et de la thérapie ciblée. Le développement du Trastuzumab, anticorps monoclonal humanisé anti-HER2, ciblant

les patientes de ce groupe est un succès (Pour plus de détails sur le Trastuzumab, Cf. Partie I.2.2. Les chimiothérapies ciblées). En effet, il permet de ralentir la progression tumorale de patientes qui sont la plupart du temps réfractaires aux autres formes de chimiothérapies.

- « **Normal breast-like** » : ces carcinomes expriment des gènes connus pour être exprimés par des cellules non épithéliales. Ce dernier sous-type reste assez mal défini.

### I.1.3. La carcinogenèse mammaire

La carcinogenèse est un phénomène multifactoriel correspondant à l'ensemble des étapes conduisant à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Chaque altération génétique confère aux cellules des avantages sélectifs menant à la transformation des cellules normales en cellules tumorales. Hanahan et Weinberg ont décrit en 2000 dans le journal « Cell », six altérations essentielles communes aux différents cancers qui permettent aux cellules transformées de prendre l'ascendant sur les autres<sup>29</sup>. Ces altérations sont : l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance cellulaire ou du cycle cellulaire ; la perte de sensibilité des signaux antiprolifératifs ; l'échappement à l'apoptose ; le potentiel répliatif illimité ; la conversion angiogénique ; le potentiel invasif et métastatique<sup>29</sup>. L'acquisition de ces caractéristiques résulte de l'accumulation d'altérations génétiques et d'une exposition soutenue des cellules aux signaux de prolifération. Classiquement, on distingue 3 phases dans la cancérogenèse mammaire : l'initiation qui correspond aux premières mutations ; la progression qui est l'étape de constitution et de développement de la tumeur mammaire ; puis la dissémination (Figure 4).

#### I.1.3.1. Phase d'initiation : les altérations génétiques retrouvées dans le cancer du sein

En dehors des prédispositions génétiques, retrouvées seulement dans 5 à 10% des cas, de multiples altérations génétiques peuvent apparaître au cours de la transformation maligne. Ces altérations peuvent être de différentes natures : délétions chromosomiques, translocations, amplifications et réarrangements géniques, duplications ou pertes

(aneuploïdie) de chromosomes entiers et mutations ponctuelles. De manière schématique, ces altérations sont responsables de l'activation d'oncogènes ou proto-oncogènes, de l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, ou encore de l'altération de gènes agissant notamment sur le « modelage » de la chromatine ou sur le degré de méthylation de l'ADN (altérations épigénétiques).

#### **I.1.3.1.1. L'activation d'oncogènes ou proto-oncogènes**

Plus de 15% des tumeurs mammaires diagnostiquées présentent une amplification de proto-oncogènes et donc une surexpression de leurs produits, comme *HER2* qui code pour le récepteur HER2, *CCND1* qui code pour la cycline D1<sup>30</sup>, et *c-myc* qui code pour un facteur de transcription impliqué dans la croissance, la différenciation, et l'apoptose cellulaire<sup>31</sup>. D'autres gènes peuvent être amplifiés à un moindre taux (10% et moins) dans des tumeurs mammaires. C'est le cas des gènes codant pour 2 récepteurs membranaires de la famille FGF (Fibroblast Growth Factor) et du gène *IGFR1* codant pour le récepteur de l'IGF1 (Insulin like Growth Factor 1).

#### **I.1.3.1.2. L'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur**

Cette catégorie de gène peut être subdivisée en 3 groupes : les premiers sont appelés garants de la stabilité du génome (tels que p53, BRCA) ; les seconds, inhibiteurs de la croissance cellulaire (tels que Rb, PTEN) et les derniers, modulateurs du microenvironnement cellulaire (tels que E-Cadhérine, CD44). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de leur inactivation, les principaux sont les mutations et altérations épigénétiques. La plupart de ces gènes (Rb ou p53) agissant de manière récessive, l'altération des deux allèles est nécessaire pour leur inactivation<sup>32</sup>. En réalité, les tumeurs ne possèdent plus qu'un seul allèle muté, le second allèle ayant été perdu lors d'un remaniement génétique (LOH : Loss of heterozygosity) ayant conduit à la délétion plus ou moins importante du chromosome.

#### **I.1.3.1.3. L'altération épigénétique**

Les altérations épigénétiques agissent sur le modelage de la chromatine ou sur le degré de méthylation de l'ADN, et ont pour conséquence de provoquer des modifications de l'expression des gènes cités précédemment (oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs). Par exemple, c'est le cas du gène suppresseur de tumeur PTEN, inactivé par une hyperméthylation de ses séquences promotrices dans 40% des cancers du sein sporadiques<sup>33,34</sup>.

L'altération épigénétique des gènes touche souvent des gènes impliqués dans la stabilité du génome et peut être ainsi responsable d'une instabilité génétique. Celle-ci correspond à des déficiences dans les systèmes de réparations par excision de nucléotides, de bases, des cassures simple brin et double brin. L'altération peut aussi toucher des gènes du système de réparation des mésappariements (hMSH1-2)<sup>35-37</sup>. Ceci se traduit par des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire (activation d'oncogènes et inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, cités ci-dessus) et dans la résistance à l'apoptose. De nombreux travaux suggèrent également l'importance des altérations épigénétiques pour inactiver des gènes suppresseurs de tumeur dans les cancers du sein. C'est le cas par exemple du gène BRCA1 dans 15 à 30% des tumeurs du sein sporadiques<sup>34</sup>.

#### **I.1.3.2. Phase de promotion : les molécules promotrices dans le cancer du sein**

Lorsque les cellules entrent dans la seconde étape dite de promotion, elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance grâce aux proto-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Cette acquisition d'indépendance peut se faire de plusieurs manières :

- soit la cellule est capable de synthétiser elle-même un certain nombre de facteurs : on parle alors de contrôle autocrine notamment avec une augmentation de la synthèse et une surexpression d'IGF, d'EGF ou encore de TGF- $\alpha$ ,

- soit il y a une surexpression des récepteurs transducteurs de signaux comme par exemple *c-erbB2* ou le récepteur de l'EGF<sup>38,39</sup>,

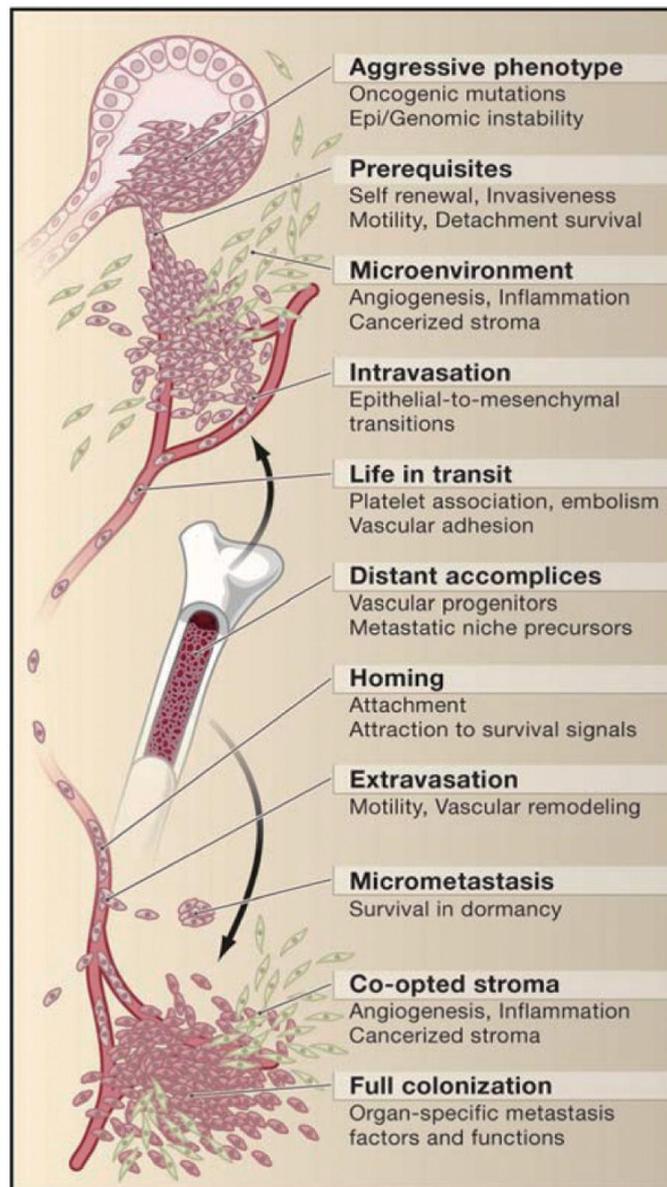
- soit la cellule surexprime des facteurs de transcription, par exemple le proto-oncogène *c-myc*. Dans la cellule normale, il forme un dimère avec la protéine Max et induit la prolifération cellulaire. Ce stimulus est régulé dans les conditions physiologiques par le complexe Mad-Max. En cas de surexpression de *c-myc*, le complexe Myc-Max est favorisé au dépend de Mad-Max ce qui entraîne une prolifération cellulaire non régulée<sup>38,39</sup>.

Les mécanismes de cancérisation sont aussi provoqués par la perte d'un certain nombre de contrôles sur la croissance cellulaire, avec notamment des pertes de fonctionnalité des anti-oncogènes. Deux anti-oncogènes majeurs interviennent dans la régulation du cycle cellulaire, la protéine du rétinoblastome (pRb) et le produit du gène p53. La protéine pRb peut, en fonction de son état de phosphorylation, bloquer le cycle cellulaire (hypophosphorylée) ou contrôler sa progression (hyperphosphorylée). Le stade hypophosphorylé est notamment maintenu par le TGF- $\beta$  (« Tumor Growth Factor- $\beta$  »), qui bloque en même temps l'expression de *c-myc*. Une mutation ou une perte de fonctionnalité de TGF- $\beta$  ou de son récepteur provoque de manière concomitante la phosphorylation de pRb, donc une avancée des cellules dans le cycle cellulaire et l'expression de *c-myc*, favorisant la prolifération cellulaire. Le gène p53 contrôle lui aussi l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages causés à l'ADN, soit pour permettre sa réparation, soit si celle-ci est impossible, pour entraîner l'apoptose. En présence de p53 muté, l'ADN n'est plus réparé, il en résulte une instabilité génomique associée à une accumulation de mutations provoquant une croissance incontrôlée<sup>40</sup>.

### **1.1.3.3. Phase de dissémination : le processus métastatique dans le cancer du sein**

Le développement d'une tumeur dans la glande mammaire ne se limite pas à la prolifération anarchique et incontrôlée de cellules néoplasiques exposées à des signaux de prolifération. Au cours de leur prolifération, les cellules cancéreuses peuvent ainsi subir une dédifférenciation plus importante, qui leur permet d'acquérir des propriétés migratrices et invasives des tissus environnants la glande mammaire. Ces nouvelles propriétés se définissent sous le terme de transition épithélio-mésenchymateuse que subissent les cellules tumorales mammaires, et qui reflètent les modifications dans les interactions entre cellules au sein du tissu mammaire et un changement important dans l'expression des gènes. La

modification de la matrice extracellulaire est ainsi une étape importante au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, non seulement nécessaire à l'invasion par les cellules tumorales mais aussi à leur prolifération. Elle permet aussi la formation de néovaisseaux (Cf. Partie I.1.4.2. L'angiogenèse tumorale), qui favorise la croissance tumorale et par la suite, représente le point de départ des cellules cancéreuses migrant à travers leur paroi pour donner naissance à des sites métastatiques (Figure 4). L'acquisition d'un pouvoir migrant, invasif et métastatique, s'accompagne donc de la capacité des cellules tumorales mammaires à sécréter des substances telles que le VEGF qui stimule la néo-angiogénèse, mais également des métalloprotéases matricielles (MMP). Ces dernières constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation protéolytique de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire dont la lame basale. Les MMP sont d'ailleurs devenues des cibles potentielles dans le traitement anticancéreux<sup>41</sup>. Les collagénases et les gélatinases de la famille des MMP, qui dégradent le collagène de la matrice extracellulaire, sont particulièrement sécrétées par les cellules tumorales mammaires malignes et peuvent ainsi promouvoir des métastases osseuses<sup>42</sup>. La transition épithélio-mésenchymateuse conduit également à l'expression de gènes modifiant le cytosquelette et la perte d'adhésion des cellules tumorales, pour favoriser leur migration. C'est le cas des cellules de carcinomes mammaires canaux, représentant 80% des cancers du sein. Ces dernières, après une prolifération importante envahissant le canal galactophore, acquièrent des propriétés invasives, débutant par la digestion de la lame basale après sécrétion de MMP, puis par l'envahissement du stroma qui s'accompagne d'une expression de la vimentine et de la perte d'expression de cytokératines et de la cadhérine E<sup>43</sup>. Il est à noter qu'au cours de leur migration dans les tissus environnants, les cellules tumorales mammaires reçoivent également des stimuli provenant soit des fibroblastes activés, remaniant la matrice extracellulaire propice à la migration et l'invasion tumorale, soit des macrophages infiltrants la tumeur qui sécrètent l'EGF<sup>43</sup>.



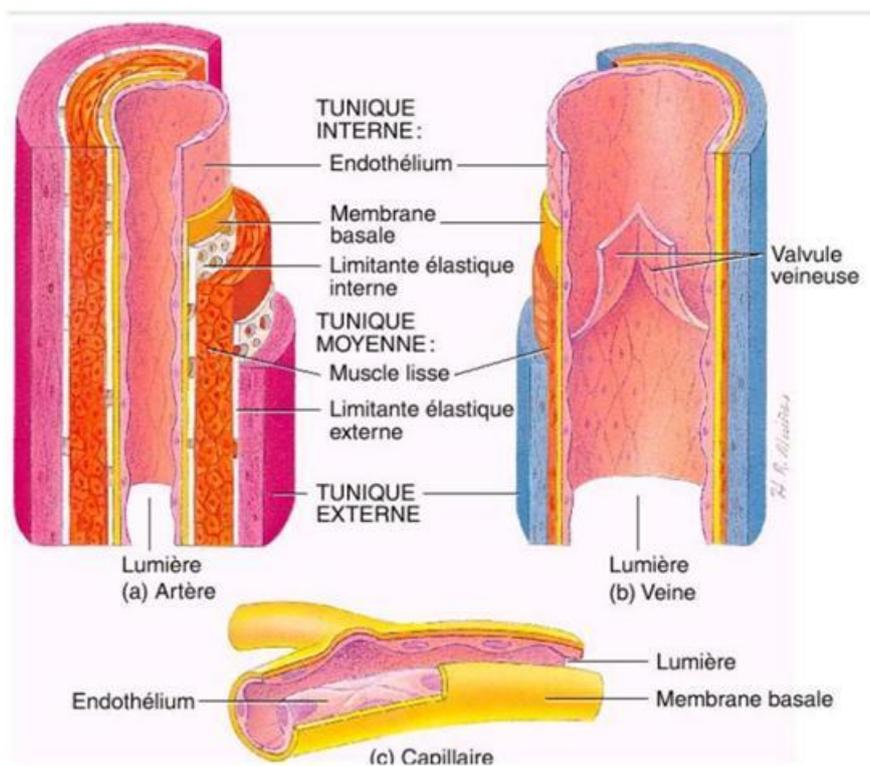
**Figure 4 : Différentes étapes de la progression métastatique.** Les métastases font suites à l'acquisition de caractéristiques qui permettent aux cellules originaires d'un organe de se disséminer et de coloniser un second site. Source<sup>44</sup>.

## I.1.4. La vascularisation de la tumeur mammaire

### I.1.4.1. Structure des vaisseaux normaux et intra-tumoraux

#### I.1.4.1.1. Structure normale du vaisseau sanguin

Les vaisseaux de moyens et gros calibres sont constitués de trois couches distinctes possédant chacune une structure et des fonctions spécifiques (Figure 5). Les capillaires et les artérioles sont eux uniquement composés d'une couche de cellules endothéliales.



**Figure 5 : Structure de la paroi vasculaire.** Une couche de cellules endothéliales compose la paroi la plus interne (endothélium, intima). Le feuillet intermédiaire (media) est composé de plusieurs couches de cellules musculaires. La paroi externe (adventice) est composée de tissu conjonctif contenant du collagène et des fibroblastes.

**L'intima** ou tunique interne, est la paroi la plus interne de tous les vaisseaux sanguins. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une couche de tissu conjonctif fibro-élastique et dans quelques cas d'une limitante élastique interne. Les cellules endothéliales sont imbriquées les unes dans les autres formant ainsi une couverture étanche qui sera directement en contact avec le sang. Cet endothélium possède différentes propriétés métaboliques (conversion de l'angiotensine, synthèse de substances vasoactives),

de thromborésistance (synthèse de prostaglandine I<sub>2</sub>, antithrombine III...) et immunitaire (synthèse d'IL-1). La couche sous-endothéliale du tissu conjonctif contient des fibres de collagène, quelques fibres élastiques, des fibres musculaires lisses et des fibroblastes qui produisent des protéoglycanes, des glycosaminoglycanes (en particulier des héparane-sulfates), du glycogène, de l'élastine et de la laminine. Elle renferme également un grand nombre de cellules du système immunitaire.

**La media** ou tunique moyenne, est le niveau intermédiaire. Elle constitue la couche la plus épaisse et représente le constituant principal de l'artère. Elle est essentiellement constituée de cellules musculaires lisses (CMLs), empilées de façon concentrique en couches appelées unités lamellaires. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artère : d'une couche pour les artérioles, à plusieurs couches pour les artères élastiques. Chaque unité lamellaire est composée de cellules musculaires lisses entourées d'une matrice extracellulaire constituée de protéines fibreuses et élastiques (collagène et élastine) et de mucopolysaccharides. Hormis dans l'aorte thoracique, la media est avasculaire, sauf dans sa partie externe qui reçoit l'irrigation des *vasa vasorum* de l'adventice. Une lame d'élastine, la limitante élastique externe, sépare la media de l'adventice. Cette limitante n'est toutefois rencontrée que dans les vaisseaux de fort calibre.

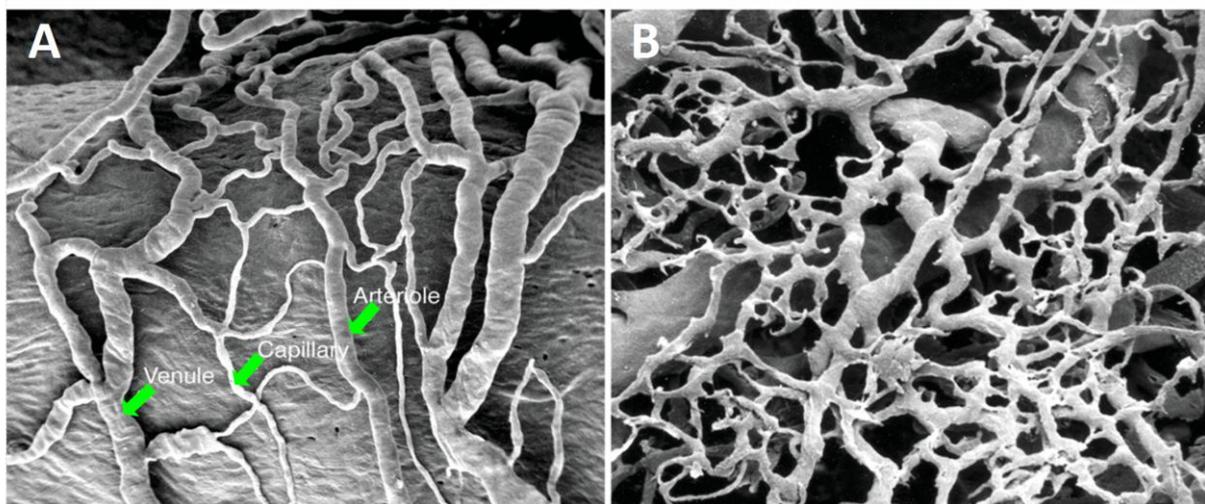
**L'adventice** ou tunique externe, est la couche la plus externe du vaisseau. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, contenant des fibroblastes et des adipocytes et d'une enveloppe qui assure l'ancrage des artères aux structures avoisinantes. Elle est irriguée par des *vasa vasorum* qui ont un rôle nourricier pour l'adventice elle-même et pour la partie externe de la media. Un réseau de nerfs vasomoteurs non myélinisés rejoint les fibres musculaires lisses de la media. Elle est aussi parfois parcourue par des fibres musculaires lisses longitudinales.

Il faut noter des particularités selon le calibre des vaisseaux. Les artérioles sont uniquement constituées d'un endothélium et d'une limitante élastique interne. Les petites et moyennes artères sont de type musculaire, où les fibres musculaires lisses prédominent. Les grandes artères sont de type élastique, riches en élastine.

#### I.1.4.1.2. Différences entre vaisseaux normaux et tumoraux

Les vaisseaux intra-tumoraux ont une structure et des caractéristiques bien différentes des vaisseaux « normaux ». Ces différences sont essentiellement dues à la sécrétion constante de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales<sup>45</sup>.

Les vaisseaux irrigants une tumeur sont désordonnés d'un point de vue architectural (Figure 6). A cause d'un grand nombre de ramifications et branchements en cul de sac, leur organisation est dite en « mosaïque ». De plus, ces vaisseaux ne sont pas organisés en veinules/artérioles/capillaires. Cependant, il arrive que certains vaisseaux en présentent des caractéristiques spécifiques.

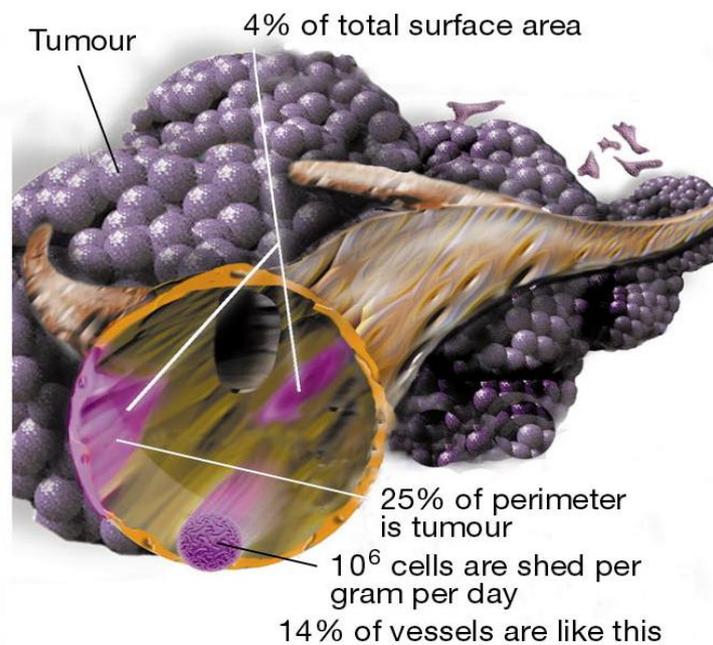


**Figure 6: Architecture des vaisseaux normaux et tumoraux. Images issues de microscopie électronique à balayage. Vascularisation normale (A) : les vaisseaux normaux présentent une structure bien organisée en artérioles, capillaires et veinules. Vascularisation tumorale (B) : En comparaison, les vaisseaux tumoraux sont désorganisés sans distinction des différentes hiérarchisations des vaisseaux. Source<sup>45</sup>.**

D'un point de vue structurel, la paroi des vaisseaux intra-tumoraux est généralement incomplète avec des lacunes au niveau de la membrane basale ainsi qu'une raréfaction des cellules accessoires, principalement les péricytes et les cellules musculaires lisses.

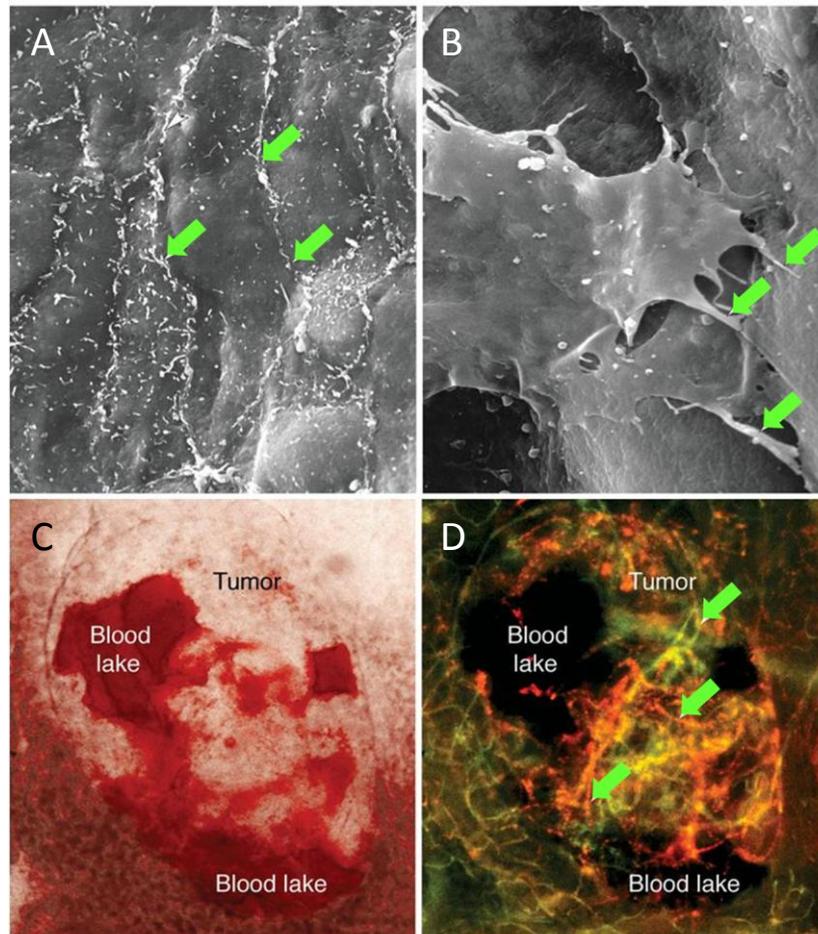
- La paroi n'est pas aussi clairement délimitée en couches cellulaires distinctes (intima, media, adventice) que la paroi normale.
- Des pseudo-vaisseaux peuvent se former dans la tumeur<sup>46</sup> : il s'agit de conduites créées dans le tissu tumoral, bordées de cellules tumorales et non pas de cellules

endothéliales, phénomène appelé pour cette raison « mimétisme vasculaire ». Ce phénomène implique que des cellules tumorales miment certaines caractéristiques des cellules endothéliales (Figure 7). Elles expriment des protéines comme le CD31, les VEGFR-1 et 2, la vascular endothelial (VE) cadherine, la laminine-5 ou encore le marqueur CD34. Ce type de profil d'expression génétique permet aux cellules tumorales de dégrader la matrice extracellulaire (MEC), de migrer et de former des capillaires à l'instar des cellules endothéliales<sup>47</sup>. Dans 14% des vaisseaux, les cellules tumorales peuvent représenter jusqu'à 25% du périmètre de la paroi vasculaire et 1 million de cellules tumorales par gramme et par jour peuvent être relarguées dans la circulation sanguine<sup>48</sup>.



**Figure 7 : Implication des cellules tumorales dans la vasculogénèse tumorale.** 25% du diamètre des vaisseaux est composé de cellules tumorales. Environ  $10^6$  cellules tumorales/gramme de tumeur/ jours sont larguées dans la circulation sanguine. Source<sup>48</sup>.

- Les vaisseaux intra-tumoraux sont très perméables, notamment à cause des faibles jonctions entre les cellules endothéliales. Cela engendre la formation de lits vasculaires, engendrant des hémorragies intra-tumorales (Figure 8).



**Figure 8: Perméabilité accrue des vaisseaux intra-tumoraux et formation de lits vasculaires.** (A) Les vaisseaux normaux présentent des jonctions entre les cellules endothéliales serrées (Flèches). (B) Les vaisseaux tumoraux ne possèdent pas ces jonctions serrées, on remarque de larges espaces pour les vaisseaux intra-tumoraux (Flèches) responsables de la formation de lits vasculaires. (C) Lits vasculaires intra-tumoraux vus en microscopie optique et (D) à fluorescence. En fluorescence, la couleur verte représente la lectine qui permet de visualiser le réseau sanguin, et la couleur rouge correspond à des liposomes cationiques injectés par intraveineuse permettant de visualiser la circulation sanguine. Les lits vasculaires ne sont donc pas en continuité avec le réseau sanguin et ne comportent aucune trace du traceur fluorescent, signe que ces lits proviennent d'hémorragies. Source<sup>45</sup>.

#### 1.1.4.2. L'angiogenèse tumorale

Pour échapper à la nécrose, la tumeur met en place un processus de néovascularisation qui se déroule schématiquement en deux temps. L'angiogenèse « précoce » correspond à la déstabilisation de la paroi existante, à la dégradation de la MEC, et au bourgeonnement des cellules endothéliales en néo-capillaire. L'angiogenèse « tardive » correspond, elle, à l'artérialisation, c'est-à-dire à la maturation structurelle du néovaisseau, avec la migration et

l'adjonction de cellules musculaires (péricytes et CMLs), qui stabilisent la paroi et protègent les cellules endothéliales. Cette formation de néovaisseaux découle d'un événement clé dans l'initiation de la vascularisation tumorale : le switch angiogénique (Figure 9).

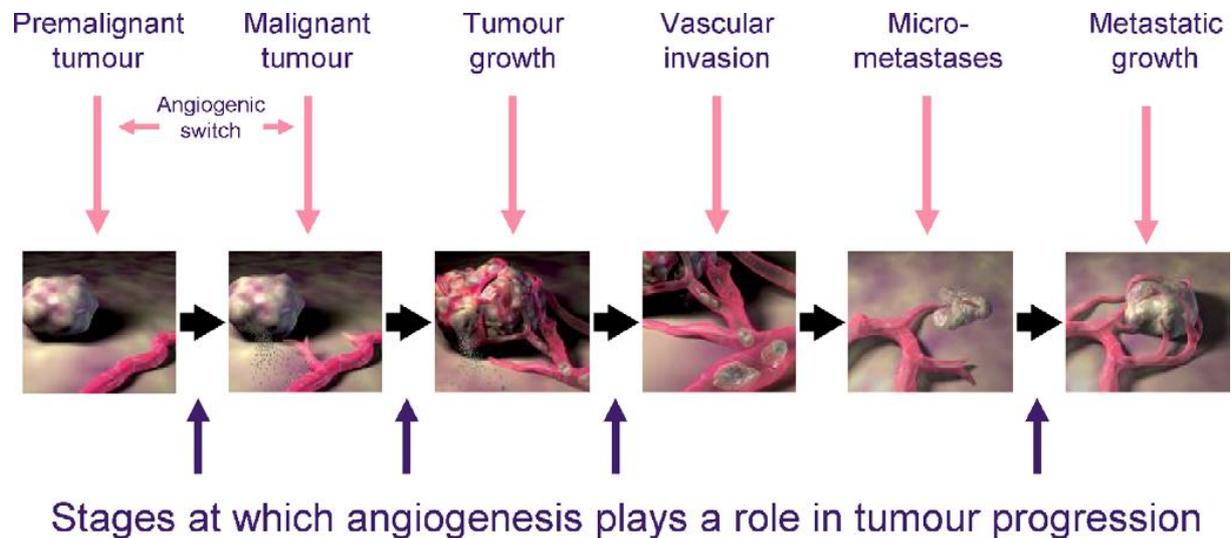


Figure 9 : Rôle de l'angiogénèse à différentes étapes du développement tumoral. Source<sup>49</sup>.

#### 1.1.4.2.1. Le switch angiogénique

L'initiation de la vascularisation tumorale est due à une dérégulation de la balance entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Contrairement aux conditions physiologiques normales où les facteurs anti-angiogéniques sont prépondérants par rapport aux facteurs pro-angiogéniques, le switch angiogénique permet l'inversion de cette balance entraînant l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux péri-tumoraux.

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur est au stade primitif, elle est alimentée uniquement par diffusion passive et elle ne se développe que très lentement. On parle de phase dormante ou avasculaire. Les carcinomes *in situ* peuvent rester dans cet état d'équilibre pendant plusieurs années sauf s'ils peuvent acquérir un phénotype angiogénique, résultat de la surexpression de gènes codant pour des stimulateurs angiogéniques. En effet, au-delà de 1-2 mm de diamètre, l'apport de nutriments et d'oxygène ne peut plus se faire par diffusion et la tumeur doit commencer à développer un nouveau réseau sanguin pour se nourrir et croître, autrement-dit la tumeur doit se vasculariser.

La rupture d'équilibre entre les deux phases se nomme le switch angiogénique<sup>50</sup>, elle est marquée par une augmentation des facteurs pro-angiogéniques et peut être conduite par plusieurs voies :

- Certains oncogènes régulent positivement l'expression des facteurs de croissance et amoindrissent l'expression des inhibiteurs<sup>51</sup>.
- L'hypoxie intra-tumorale induite par la forte prolifération tumorale peut activer le facteur HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1) qui lui-même entraîne une surexpression des protéines angiogéniques<sup>48</sup>.
- Les cellules tumorales peuvent générer des facteurs pro-angiogéniques.

Au sein d'un carcinome, toutes les cellules ne vont pas « switcher » et induisent l'angiogenèse tumorale. Des expériences réalisées sur des cellules cancéreuses humaines ont révélé que seulement 1% des cellules tumorales pouvaient conduire à une tumeur vascularisée<sup>52</sup>. Le switch angiogénique est associé à une diminution marquée du taux d'apoptose des cellules tumorales.

#### **I.1.4.2.2. Angiogenèse précoce**

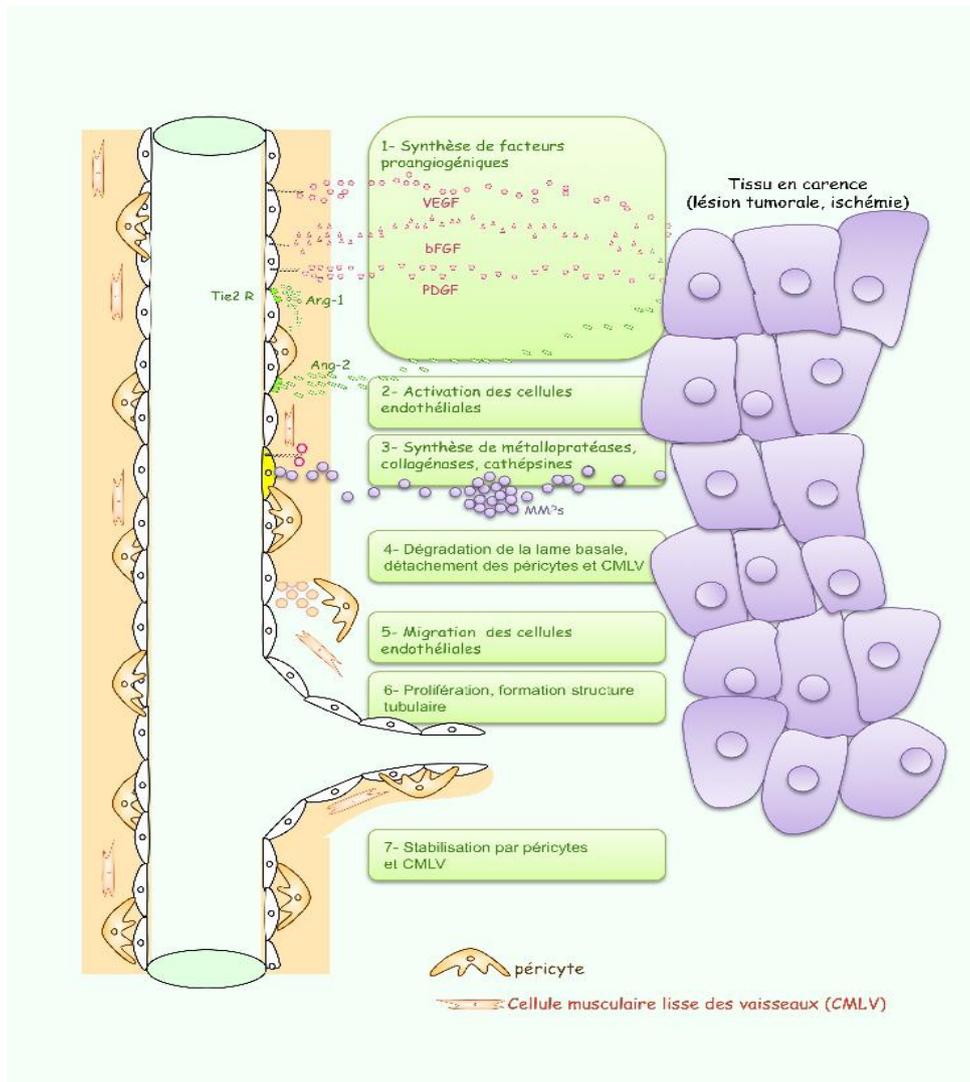
L'angiogenèse précoce correspond au processus initial de l'angiogenèse, à savoir la stimulation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, conduisant à la libération de protéases, incluant les métalloprotéases matricielles (MMP) qui vont conduire à la dégradation de la matrice extracellulaire<sup>53,54</sup>. Les facteurs pro-angiogéniques, particulièrement le VEGF-A, stimulent la migration et l'invasion des cellules endothéliales en activant différentes voies de signalisation.

Une fois le processus angiogénique déclenché par la tumeur, le recrutement de nouveaux vaisseaux est assuré par l'expression d'une série de facteurs de croissance sécrétés par les cellules cancéreuses dont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor). Leurs gènes sont régulés par un facteur sensible à l'hypoxie, nommé HIF-1 $\alpha$ <sup>55</sup>. Ces molécules sont destinées à déstructurer la paroi vasculaire afin de faciliter la prolifération et la migration des cellules endothéliales vers la tumeur en formation (Figure 9). Sous la pression exercée par la prolifération des cellules endothéliales, l'activation des cellules immunitaires (macrophages et lymphocytes), induite par les facteurs de

croissance et le début de la dégradation de la MEC, les péricytes vont se détacher de la paroi vasculaire et ainsi laisser le champ libre à la formation d'un bourgeon capillaire. Toutefois, les détails et la régulation de ces phénomènes, restent largement méconnus.

Le remaniement de la MEC implique la production de collagénase, d'héparinase, d'activateur du plasminogène (uPA), des MMPs, par les cellules de l'endothélium des vaisseaux sanguins. 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 MEC 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. La membrane basale est constituée de collagène de type IV, de laminine, de fibronectine et d'autres composants matriciels. La MMP-2 (la gélatinase A), participe à la dégradation de cette membrane. 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 (gélatinase B), lyse les fibres d'élastine et les noyaux protéiques des protéoglycanes<sup>56</sup>.

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 extracellulaire et migrent en direction du stimulus angiogénique libéré par la tumeur, amorçant ainsi la formation du néovaisseau (Figure 10).



**Figure 10 : Différentes étapes de l'angiogenèse tumorale.** Angiogenèse : Formation d'un nouveau réseau vasculaire à partir de vaisseaux existants afin d'irriguer un tissu en carence. Source<sup>57</sup>.

#### I.1.4.2.3. Angiogenèse tardive

Dans les phases précoces de l'angiogenèse, les cellules endothéliales s'organisent en un réseau vasculaire intra-tumoral connecté aux vaisseaux péri-tumoraux. Ainsi, les cellules s'assemblent en tubes pourvus d'une lumière grâce à l'interaction entre les cellules endothéliales et à la formation de jonctions. Dans le cas d'une angiogenèse physiologique, les néovaisseaux sont ensuite stabilisés par les péricytes et les cellules musculaires lisses (CMLs) des vaisseaux (Figure 10). Cette phase tardive n'est pas réalisée correctement dans le cas de l'angiogenèse tumorale. Après s'être décrochés de la paroi pour permettre la migration des cellules endothéliales, les péricytes et les CMLs, vont se différencier et

adopter un phénotype prolifératif sous l'action de facteurs de croissance tels que FGF et TGF- $\beta$ . Les gradients de concentration de facteurs tels que FGF, TGF- $\beta$  et d'autres plus spécifiques du recrutement des CMLs comme le PDGF, possèdent un rôle crucial dans la stabilisation des nouveaux vaisseaux tumoraux en induisant la migration des CMLs vers le néovaisseau<sup>58</sup>. Ces CMLs confèrent à la paroi ses caractéristiques élastiques et participent à l'échange des molécules apportées par le sang. On peut observer deux phénotypes : le phénotype contractile et le phénotype synthétique. Le phénotype synthétique correspond à des CMLs qui ne se contractent plus et qui sécrètent certains facteurs de croissance (TGF- $\beta$ ) ainsi que des produits importants comme les protéines de la MEC : fibronectine et collagène.

## I.2. Thérapies dans le cancer du sein

Le choix des diverses modalités thérapeutiques appliquées au cancer du sein s'intègre dans une stratégie de prise en charge individuelle du patient, en fonction des caractéristiques cliniques, anatomo-pathologiques et biologiques de chaque tumeur explicitées dans la partie I.1.2.2. "Les différents types de tumeurs mammaires". Nous ne nous intéresserons pas dans cette partie aux détails des protocoles cliniques, nous l'aborderons de manière générale.

Pour les carcinomes *in situ*, le traitement se limite au traitement loco-régional. Le risque métastatique étant minime, il n'y a donc pas d'indication pour un traitement adjuvant systémique. Au contraire, pour la majorité des autres cancers du sein, à savoir des carcinomes canaux infiltrant, la maladie doit être considérée comme hétérogène à la fois locale et générale. En conséquence, le traitement sera à la fois :

- **loco-régional** : traitement à base de chirurgie et radiothérapie. Dans la grande majorité des cas c'est le premier des traitements. En revanche, en présence de cancers inflammatoires ou de certaines tumeurs très volumineuses, la prise en charge par la chirurgie en premier lieu est contre-indiquée. Ces situations vont nécessiter une thérapeutique systémique dite néo-adjuvante puisqu'elle intervient avant le traitement loco-régional.
- **général ou systémique** : les traitements néo-adjuvant (avant le traitement loco-régional) ou adjuvant (après le traitement loco-régional) sont utilisés pour prévenir ou traiter les métastases. Ces traitements sont plus communément appelés chimiothérapie et hormonothérapie. La prévention des métastases, même si le cancer ne se présente que sous une forme localisée, est très importante. En effet, près de la moitié des patientes atteintes d'un cancer du sein et traitées exclusivement au niveau loco-régional, vont développer des métastases dans les cinq ans qui suivent.

## **I.2.1. Les chimiothérapies classiques**

### **I.2.1.1. Les différentes classes d'agents anticancéreux utilisées dans le cadre du cancer du sein**

D'après les critères d'évaluation de la réponse antitumorale en clinique (RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumors), la réponse au traitement équivaut à une diminution d'au moins 30 % du volume tumoral<sup>59</sup>. Les agents de chimiothérapies sont actifs dans 90% des tumeurs primaires mais seulement dans 50% des métastases<sup>60</sup>. Depuis les 30 dernières années les traitements du cancer du sein sont en constante évolution, avec l'avènement des anthracyclines (Doxorubicine...) dans les années 80, des taxanes (Paclitaxel, Docetaxel..) dans les années 90 et le début de l'utilisation des thérapies ciblées dans les années 2000<sup>46</sup>.

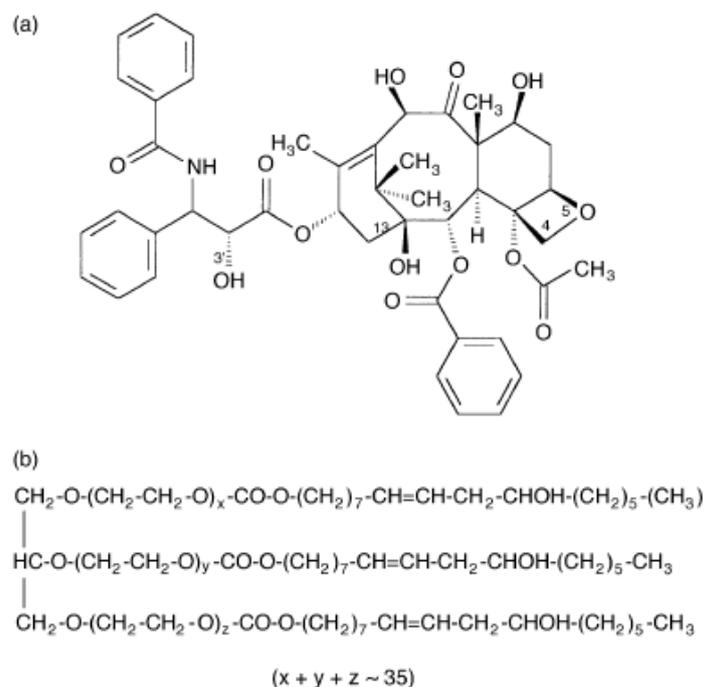
Les différentes classes d'agents anticancéreux classiques et leur mode d'action sont résumés dans la Table 3.

CLASSE	Principe actif (DCI)	Nom commercial	MODE D'ACTION
<b>Antimétabolites</b>	5 Fluoro-uracile	Fluoro-uracile	Inhibition de la synthèse des acides nucléiques, première étape nécessaire à toute synthèse d'ARN ou ADN
	Capécitabine	Xéloda	
<b>Poison du fuseau</b>	Vincristine	Oncovin	Action sur le cytosquelette de la cellule en bloquant l'équilibre dynamique (polymérisation/dépolymérisation) des microtubules lors de la mitose
	Vinblastine	Velbé	
	Vinorelbine	Navelbine	
	<i>Paclitaxel</i>	<i>Taxol®</i>	
	Docetaxel	Taxotère	
<b>Intercalants</b>	Doxorubicine	Adriablastine	Intercalant de l'ADN
	Epirubicine	Farmorubicine	Inhibition des topoisomérases Production de radicaux libres
<b>Alkylants et platinants</b>	Cyclophosphamide	Endoxan	Liaisons covalentes avec diverses molécules biologiques en particulier l'ADN, ce qui perturbe la synthèse des protéines et la division cellulaire. Production de radicaux libres
	Ifosfamide	Holoxan	

**Table 3 : Les différentes classes d'agents anticancéreux indiqués dans le cancer du sein et classés par leur mode d'action.** Ces molécules sont utilisées avec des fréquences variables pour le traitement des cancers du sein.

### 1.2.1.2. Le Paclitaxel

Le Paclitaxel (PTX), chef de file des taxanes, a été isolé en 1960 de l'if du Pacifique (*Taxus brevifolia*, famille des Taxaceae), un petit conifère des forêts du nord-ouest des Etats-Unis. Au cours des années 1960, des chercheurs ont trouvé que l'écorce de cet arbre exerçait une cytotoxicité sur les cultures de cellules *in vitro*. En 1969, le PTX fut isolé de l'écorce en quantités suffisantes pour permettre l'identification de sa structure chimique<sup>61</sup> (Figure 11 A). Étant donné la difficulté d'approvisionnement et la complexité de la méthode de purification, l'intérêt initial pour le PTX fut faible et son développement fut freiné pendant quelques années. Dans les années 1970, son efficacité *in vivo* fut tout de même testée sur des modèles de xénogreffes. La forte activité du PTX lui permit d'accéder aux phases de développement préclinique et clinique, en 1977. Le problème de la faible solubilité aqueuse du PTX fut résolu en développant une formulation à base d'huile de ricin polyoxyéthylée, le Crémophor-Ethanol (CrEL ; Figure 11 B). Les essais cliniques de phase I débutèrent en 1983. De sérieuses réactions d'hypersensibilité survinrent et un protocole de prémédication avec des glucocorticoïdes et des antihistaminiques fut élaboré. La durée du temps de perfusion fut aussi augmentée. En 1985, les essais de phase 2 donnèrent lieu à des résultats cliniques exceptionnels, avec un taux de réponse de 30% chez les patientes atteintes de cancer de l'ovaire réfractaire<sup>62</sup>. Dix ans plus tard son utilisation clinique fut étendue au cancer du sein et du poumon<sup>63</sup>.



**Figure 11 : Structures chimiques du Paclitaxel (A) et de son excipient le Cremophor (B).**  
Source<sup>64</sup>.

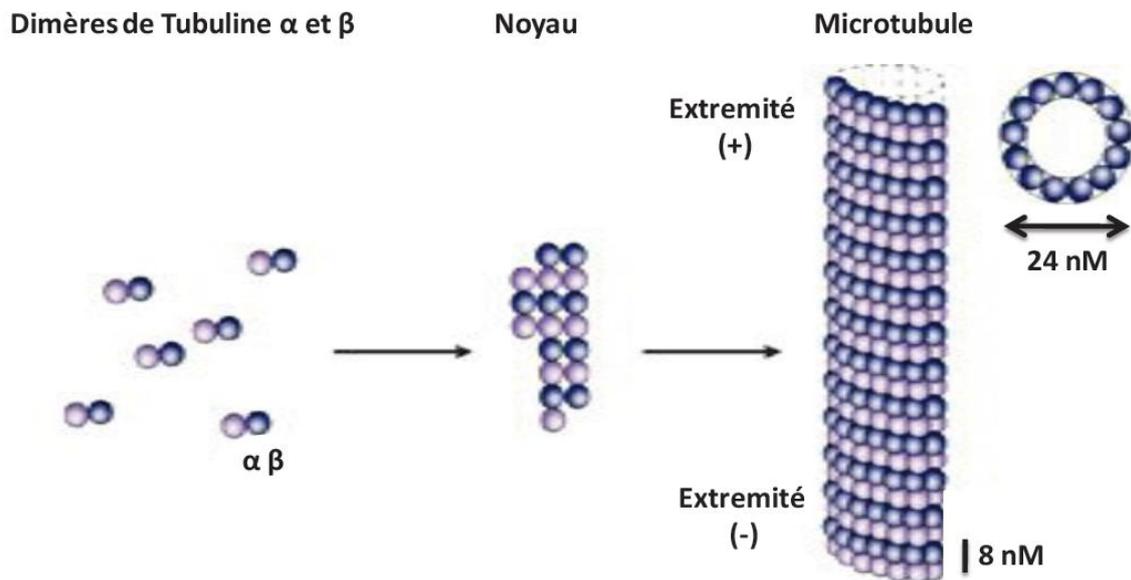
### I.2.1.2.1. Mécanismes d'action du Paclitaxel (PTX)

#### I.2.1.2.1.1 Action sur les microtubules

##### a. Rôles et structure des microtubules

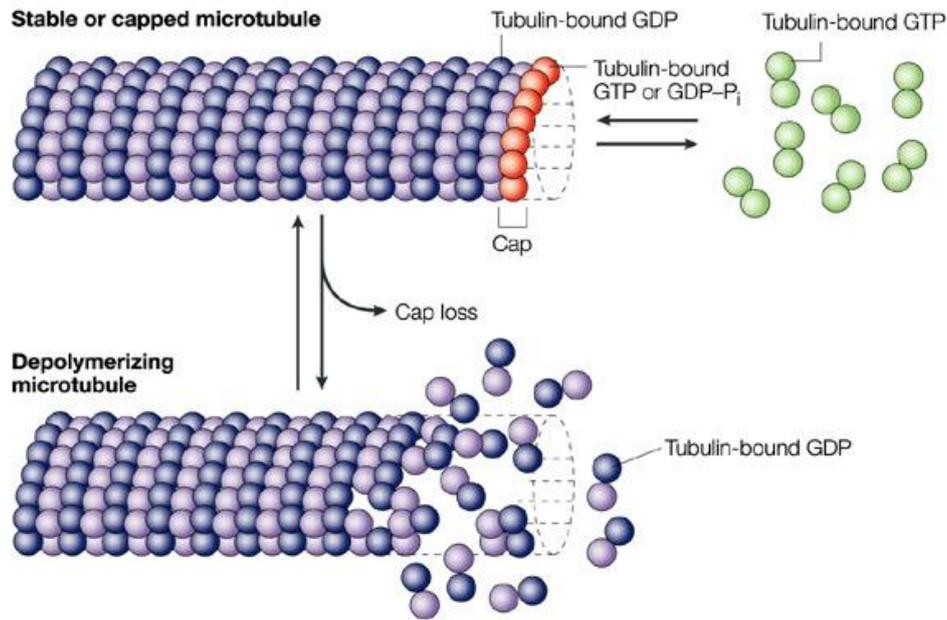
Les microtubules sont des structures fondamentales des cellules à travers leurs implications dans de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la mitose, la morphogénèse, la mobilité et le transport intracellulaire d'organelles. Ils sont composés de proto-filaments de tubuline, un dimère d'environ 110 000 Da comprenant une sous-unité de tubuline- $\alpha$  et une sous-unité de tubuline- $\beta$ <sup>65</sup>. Chacune des sous-unités du dimère est associée à une molécule de GTP. Au cours de la polymérisation des microtubules, la molécule de GTP associée à la sous-unité  $\beta$  est hydrolysée en GDP, tandis que la molécule de GTP associée à la sous-unité  $\alpha$  est non hydrolysable<sup>66</sup>. Les microtubules sont des tubes creux de 24 nm de diamètre formés de 13 proto-filaments de tubuline associés latéralement et orientés dans la même direction (Figure 12). La structure résultante est polarisée, avec une extrémité présentant des sous-unités  $\alpha$  et

une extrémité présentant des sous-unités  $\beta$ <sup>67</sup>. Cette structure leur confère une dynamique d'assemblage et de désassemblage rapide.



**Figure 12 : Polymérisation des microtubules.** Les dimères de tubulines ( $\alpha$  et  $\beta$ ) s'arrangent de façon à former un polymère très long qui servira de base nécessaire à l'élongation des microtubules. Les dimères de 8 nm de longueur s'assemblent de façon polarisée et forment des microtubules présentant deux extrémités différentes, une extrémité (+) et une extrémité (-). La structure résultante est un tube creux de 24 nm de diamètre. Source<sup>68</sup>.

Leur principale fonction est la formation du fuseau de division pendant la mitose cellulaire<sup>69</sup>. Les microtubules effectuent un réarrangement de leur organisation pour former le fuseau mitotique en début de mitose puis le fuseau central en télophase. Leur dynamique (Cf. paragraphe suivant et Figure 13), contrôlée par le point de contrôle mitotique et la phase G2, est déterminante pour le bon déroulement de la mitose et la ségrégation correcte des chromosomes. Au cours de l'interphase, les microtubules interviennent pour le maintien de la forme de la cellule, la motilité, la transduction du signal et le transport intracellulaire<sup>70</sup>. Enfin, le cytosquelette microtubulaire est aussi impliqué dans le transport de molécules spécifiques via des moteurs moléculaires qui se déplacent sur les microtubules. Ce transport est particulièrement important pour les échanges entre le noyau et le cytoplasme.



Nature Reviews | Cancer

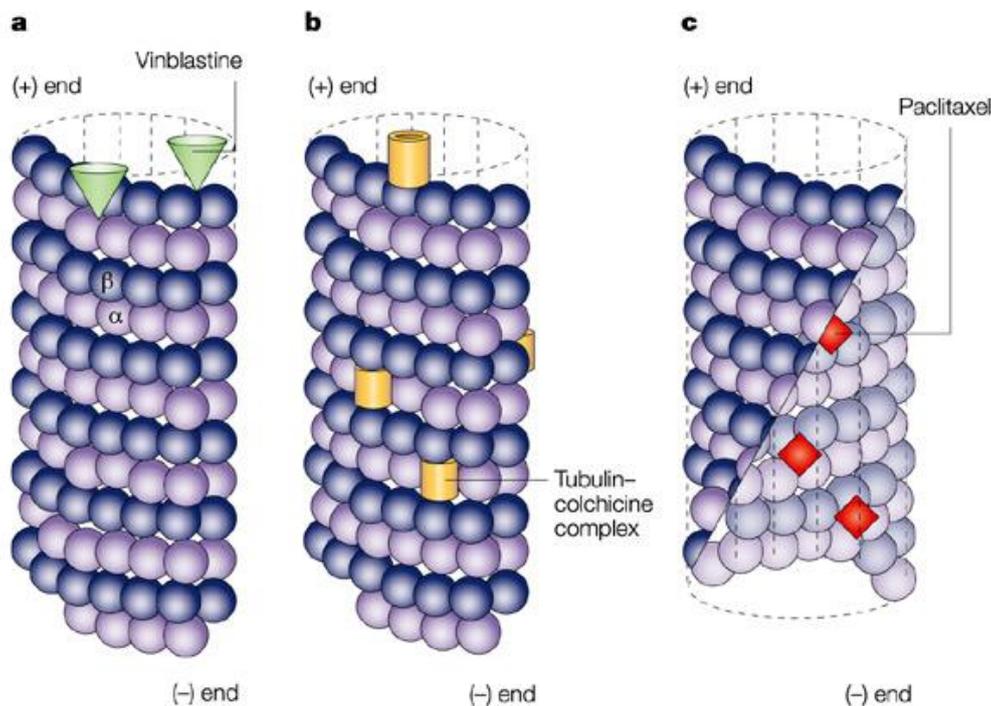
**Figure 13 : Dynamique des microtubules.** Source<sup>68</sup>.

### *b. Effet du Paclitaxel sur les microtubules*

Le PTX se lie de manière spécifique à la sous-unité  $\beta$  des microtubules, les stabilise et empêche leur dépolymérisation<sup>71,72</sup>. Il favorise aussi l'assemblage des microtubules, durant les phases de nucléation et d'élongation du processus de polymérisation, diminuant la concentration minimale requise pour la formation des microtubules. Ce phénomène se produit malgré des conditions qui normalement ne favorisent pas leur assemblage, à savoir : en absence de GTP exogène, à basse température ou à pH alcalin. L'action du PTX est modifiée en fonction de la concentration utilisée. A forte concentration (100 nM) le PTX induit la polymérisation et la stabilisation des microtubules, alors qu'à faible concentration (10 nM), le PTX permet la suppression de la dynamique des microtubules sans affecter la masse polymérique du microtubule, mais conserve quand même la capacité d'arrêt de la mitose et la mort cellulaire par apoptose<sup>73</sup>.

Le dérèglement des microtubules induit l'expression du gène suppresseur de tumeur p53 et des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (p21/Waf-1). Les cellules sont alors

maintenues en phases G2 et M (mitose) du cycle cellulaire entraînant l'apoptose ou la mort cellulaire programmée.



Nature Reviews | Cancer

**Figure 14 : Action du Paclitaxel, Vinblastine et Vincristine sur les microtubules.** (A) Quelques molécules de Vinblastine se lient avec une grande affinité à l'extrémité positive du microtubule. (B) La colchicine forme des complexes avec les dimères de tubuline et se polymérise avec eux dans le treillis. (C) Une coupe de microtubule montrant l'intérieur de la structure : le Paclitaxel se lie le long de la surface interne du microtubule empêchant sa dépolymérisation. L'action de chacune des molécules suffit à supprimer la dynamique des microtubules. Source<sup>68</sup>.

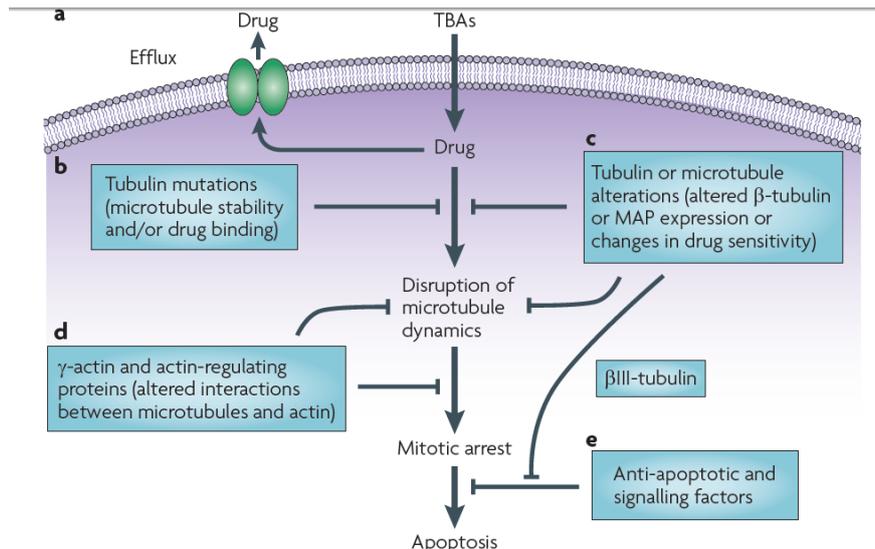
#### 1.2.1.2.1.2 Autres effets antitumoraux du Paclitaxel

Le PTX exerce aussi d'autres effets cytotoxiques. Par exemple, il peut se lier à la protéine Bcl-2, une protéine anti-apoptotique souvent surexprimée par les cellules cancéreuses, empêchant ainsi son activité et entraînant la mort cellulaire. Il peut aussi activer Bax et Bad, deux molécules pro-apoptotiques<sup>74</sup>. Les taxanes interagissent avec de nombreuses

molécules régulatrices. Le Paclitaxel induit aussi l'expression du TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ )<sup>75 76-78</sup>.

#### **1.2.1.2.1.3 Mécanismes de résistances au Paclitaxel**

Plusieurs mécanismes de résistances aux taxanes ont été caractérisés. Le premier est un mécanisme de résistance commun à de nombreuses molécules de chimiothérapie telles que les anthracyclines, les étoposides, les vinca-alcaloïdes. Il s'agit de réduction de l'accumulation de chimiothérapie à l'intérieur de la cellule due à la surexpression de protéine membranaire à efflux type glycoprotéine-P (MDR : Multi Drug Resistant). Ces MDRs ont un rôle de pompe visant à faire sortir la molécule de la cellule<sup>79</sup> (Figure 15 A). La résistance aux taxanes est due à MDR-1, et peut être inhibée par d'autres molécules telles que les bloqueurs de canaux calciques, le Tamoxifen, la Cyclosporine A et le Cremophor-El<sup>80</sup>. Le second principal mécanisme de résistance au Paclitaxel est lié à une mutation des tubulines (Figure 15 B). En effet, certaines tumeurs possèdent des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  défectueuses, c'est-à-dire que leur capacité à polymériser en microtubules est faible et leur vitesse d'assemblage lente ; les taxanes permettent de normaliser cette situation<sup>81</sup>. Plusieurs lignées cellulaires sont résistantes aux agents se fixant à la tubuline et montrent des altérations de la composition et de l'expression des différents isotypes de tubuline, ou encore des défauts dans la dynamique de polymérisation<sup>65,78,82</sup>. Enfin, d'autres mécanismes de résistances, sont décrits dans la Figure 15.



**Figure 15 : Mécanismes de résistance aux agents se liant à la tubuline.** La résistance à ces drogues est multifactorielle et différents mécanismes ont été identifiés. Ces mécanismes peuvent être regroupés en 5 catégories (A→E) : (A) Diminution de l'accumulation de drogue intracellulaire due à la surexpression de protéines membranaires à efflux type glycoprotéine-P (MDR). (B) Altération directe de la cible de la drogue suite à des mutations. (C) Altération de l'expression des isotypes de tubuline ou des protéines associées aux microtubules (MAP), qui réduisent l'efficacité des drogues. (D) Modifications des changements des microtubules induits par des interactions ou des régulations par d'autres protéines du cytosquelette telles que les protéines  $\gamma$ -actine ou les protéines régulatrices de l'actine, qui affectent la capacité des agents se liant à la tubuline à induire la mitose et la mort cellulaire<sup>83,84</sup>. (E) Défauts des voies de l'apoptose aussi sous l'influence de la résistance aux voies d'apoptose induites par les agents se liant à la tubuline<sup>85,86</sup>.

#### 1.2.1.2.2. Utilisation clinique

En clinique, une formulation spécifique du PTX est nécessaire pour son administration par voie intraveineuse. Le nom de cette formulation développée par la compagnie Bristol Myers Squibb (BMS) est le Taxol®.

##### 1.2.1.2.2.1 Formulation commerciale : le Taxol®

En 1995, la compagnie Bristol Myers Squibb (BMS) développa une technique de synthèse basée sur la fermentation de cellules végétales, afin de contourner les problèmes d'approvisionnement à partir de l'arbre *Taxus brevifolia*. Du fait de la très faible solubilité aqueuse du PTX (0,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )<sup>87</sup>, l'usage de solvants organiques et du surfactant Cremophor Ethanol (CrEL) fut nécessaire à sa solubilisation en vue de son administration intraveineuse.

La formulation Taxol® développé par BMS consiste en un liquide clair, transparent et visqueux dont chaque millilitre contient 6 mg de PTX, 527 mg de CrEL et 49.5% v/v d'éthanol déshydraté. Cette formulation Taxol® doit être diluée avec du dextrose à 5% ou du NaCl à 0.9% avant perfusion jusqu'à l'obtention des concentrations finales d'administration du PTX (0,3 et 1,2 mg/mL). Cette solution de Taxol® est stable à température ambiante jusqu'à 27 h après dilution.

Les indications thérapeutiques du Taxol® sont les cancers de l'ovaire, du sein et du poumon (non à petites cellules, tels l'adénocarcinome, le carcinome épidermoïde et le carcinome à grandes cellules). Le Taxol® est aussi indiqué en deuxième ligne de traitement du sarcome de Kaposi chez les patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine (VIH). Les doses recommandées varient entre 100 et 175 mg/m<sup>2</sup> selon l'indication<sup>74</sup>.

#### Indication particulière pour le traitement du cancer du sein :

En traitement adjuvant, le Taxol® est indiqué dans le traitement du carcinome du sein avec envahissement ganglionnaire après un traitement par anthracycline et cyclophosphamide. Le traitement adjuvant par le Taxol® doit être considéré comme une alternative à une prolongation du traitement par anthracycline et cyclophosphamide.

Le Taxol® est indiqué dans le traitement initial du cancer du sein localement avancé ou métastatique soit en association à une anthracycline chez les patientes auxquelles un traitement par anthracycline convient, soit en association au Trastuzumab chez les patientes avec une surexpression HER2 classée 3+ par immunohistochimie et auxquelles une anthracycline ne convient pas. Administré seul, le Taxol® est aussi indiqué dans le traitement des carcinomes métastatiques du sein pour les patientes en échec ou non candidates au traitement classique à base d'anthracycline.

#### **1.2.1.2.2 Le Cremophor-El**

Le Cremophor-El (CrEl) est utilisé comme "véhicule" pour la solubilisation d'un grand nombre de drogues hydrophobes dont certains anesthésiques, sédatifs, immunosuppresseurs et agents anticancéreux (Table 4). La quantité de CrEl pour solubiliser le PTX est significativement plus élevée que pour ces autres drogues<sup>69</sup>. Le volume moyen de CrEl administré pour ces autres molécules est d'environ 5 mL (1,5 à 7 mL) alors que la

solubilisation du PTX nécessite un volume approximatif de 26 mL, soit un volume cinq fois plus élevé<sup>64</sup> que pour les autres molécules.

<b>Agent thérapeutique</b>	<b>Classe</b>	<b>Volume de Cremophor utilisé pour une injection</b>
<b>Cyclosporine A</b>	Immunosuppresseur	3,5 mL
<b>Diazepam</b>	Sédatif	1,5 mL
<b>Propofol</b>	Anesthésique	7 mL
<b>Paclitaxel</b>	Anticancéreux	25,8 mL

**Table 4 : Exemples de molécules nécessitant le Cremophor-El pour leur solubilisation.**  
Source<sup>64</sup>.

Cependant, le CrEl est responsable d'effets secondaires notables. Il est considéré comme étant la cause de réactions d'hypersensibilité remarquées durant des thérapies au PTX. C'est pourquoi un traitement au Taxol® nécessite un prétraitement à base d'antihistaminiques et de corticoïdes. Malgré ces prémédications, 40% des patients ont des réactions d'hypersensibilités mineures (rash cutanés...) et 3% des réactions plus graves<sup>88</sup>. Le CrEl induit aussi une néphrotoxicité, une neurotoxicité, ainsi que des effets sur les muscles vasculaires entraînant une vasodilatation responsable de difficultés respiratoires, de léthargies et d'hypotension.

#### **1.2.1.2.2.3 Avenir du Taxol®**

Le PTX est un agent anticancéreux dont l'efficacité clinique anticancéreuse n'est plus à démontrer. Cependant, son efficacité peut être limitée par certains facteurs dont le phénotype de résistance présenté par certaines tumeurs solides (Cf. paragraphe 1.2.1.2.1.3. "Mécanismes de résistances au Paclitaxel"), ainsi que la toxicité liée au traitement, laquelle est attribuée en majeure partie aux effets secondaires du CrEL sur l'organisme. Ainsi, la mise au point d'une formulation de PTX dépourvue de CrEL présente un grand intérêt. Cet intérêt, se traduit par un grand nombre d'essais de formulation que nous décrivons dans le chapitre II.2. "Formes galéniques du Paclitaxel les plus avancées dans leur développement".

## **I.2.2. Les chimiothérapies ciblées**

Au cours des dernières années, des améliorations dans la compréhension des événements moléculaires conduisant au développement du cancer ont permis l'identification de nouvelles cibles moléculaires. Une des premières preuves de concept de cette approche a été apportée avec l'utilisation de l'anticorps monoclonal anti-HER2, le Trastuzumab ou Herceptin®, pour les patientes avec des tumeurs surexprimant le récepteur à HER2<sup>89</sup>. Puis, l'anticorps anti-VEGF, le Bevacuzimab, a confirmé l'intérêt porté à ce nouveau type de thérapies dans le cadre du cancer du sein<sup>90</sup>.

### **I.2.2.1. Chimiothérapies ciblant des facteurs de croissance dans le cancer du sein**

#### **I.2.2.1.1. L'hormonothérapie**

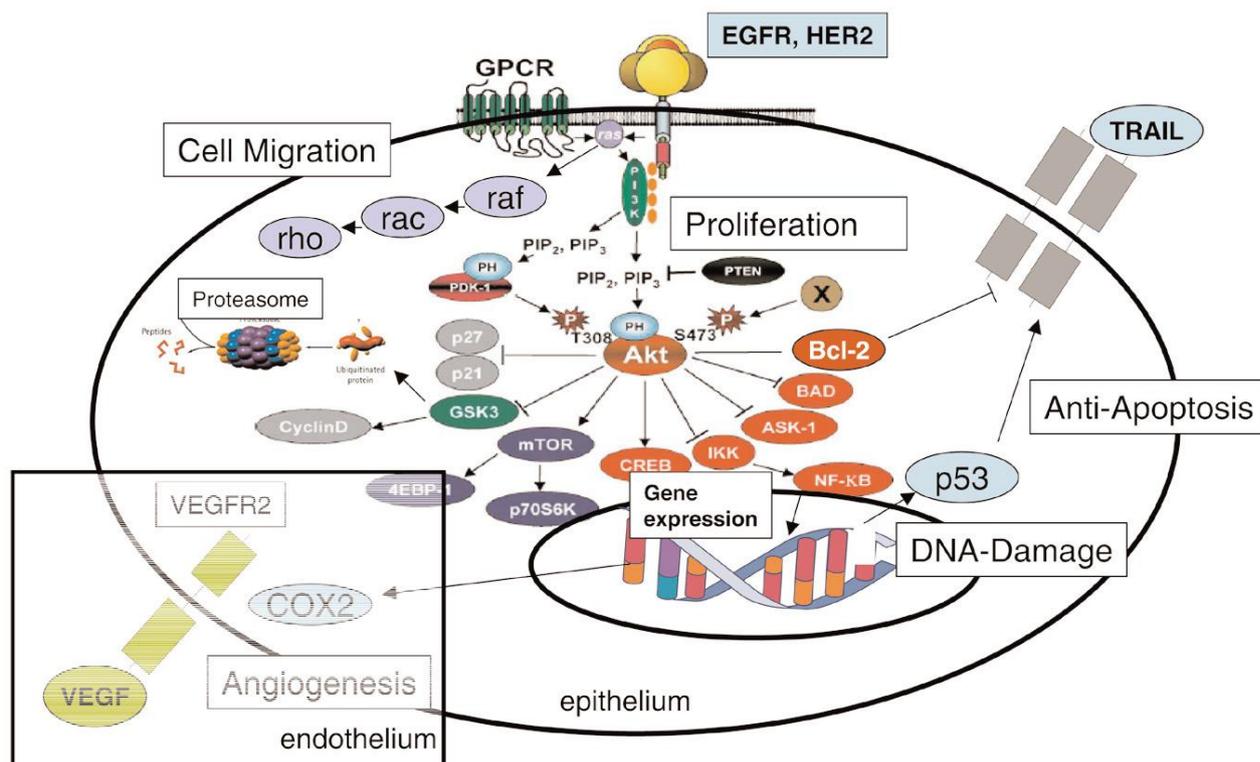
L'hormonothérapie est utilisée depuis de nombreuses années pour traiter les patientes présentant une tumeur exprimant les récepteurs hormonaux (aux œstrogènes et à la progestérone)<sup>91</sup>. Environ 60% des tumeurs mammaires sont positives pour ces types de récepteurs, ces tumeurs sont appelées hormono-dépendantes. Les hormonothérapies agissent soit en modulant l'activité des récepteurs aux estrogènes, soit en diminuant le taux d'hormones circulantes. Le Tamoxifène, un modulateur du récepteur aux estrogènes, est le traitement le plus communément utilisé depuis plus d'une vingtaine d'années<sup>92</sup>, néanmoins d'autres molécules peuvent être utilisées (Table 5). Cependant, le problème de la résistance au Tamoxifène a compliqué le traitement du cancer du sein exprimant les récepteurs aux estrogènes et une nouvelle vague de thérapies ciblées est apparue au cours de ces dix dernières années.

CLASSE	PRINCIPE ACTIF	NOM COMMERCIAL	MODE D'ACTION
<b>Antioestrogènes</b>	Tamoxifène	Nolvadex	Agoniste-antagoniste des récepteurs aux œstrogènes présentant des effets antagonistes au niveau de certains tissus en particulier au niveau de l'épithélium mammaire normal et tumoral, et des effets agonistes au niveau d'autres tissus tels que l'os et l'endomètre
	Fluvestrant	Faslodex	Antioestrogènes pur. Entre en compétition avec les œstrogènes aux niveaux de leurs récepteurs spécifiques
<b>Antiaromatases</b>	Exemestane	Aromastine	Inhibe l'activité de l'aromatase. L'aromatase est un système enzymatique qui permet la conversion des androgènes en œstrogènes
	Anastrozole	Arimidex	
	Letrozole	Femara	
<b>Progestatif</b>	Médroxyprogestérone	Depo-prodasone	Action par inhibition de l'axe hypothalamo-ovarien, ils diminuent le taux d'œstradiol
	Megestrol	Megace	
<b>Agonistes de la LH-RH</b>	Goséréline	Zoladex	Suppression de l'axe hypothalamo-ovarien, ils diminuent le taux d'œstradiol
	Leuproréline	Enantone	

**Table 5 : Différentes stratégies d'hormonothérapies utilisées pour le traitement du cancer du sein.**

### I.2.2.1.2. Voies de signalisation cellulaires pouvant être ciblées dans le cadre du cancer du sein

Parmi les cibles visées dans le cancer du sein, certaines peuvent induire l'apoptose (TRAIL, Bcl-2, Bax) ou inhiber les voies anti-apoptotiques, le cycle cellulaire (p53), la transduction du signal et l'angiogénèse. Tous ces cas de figure sont résumés dans la Figure 16.

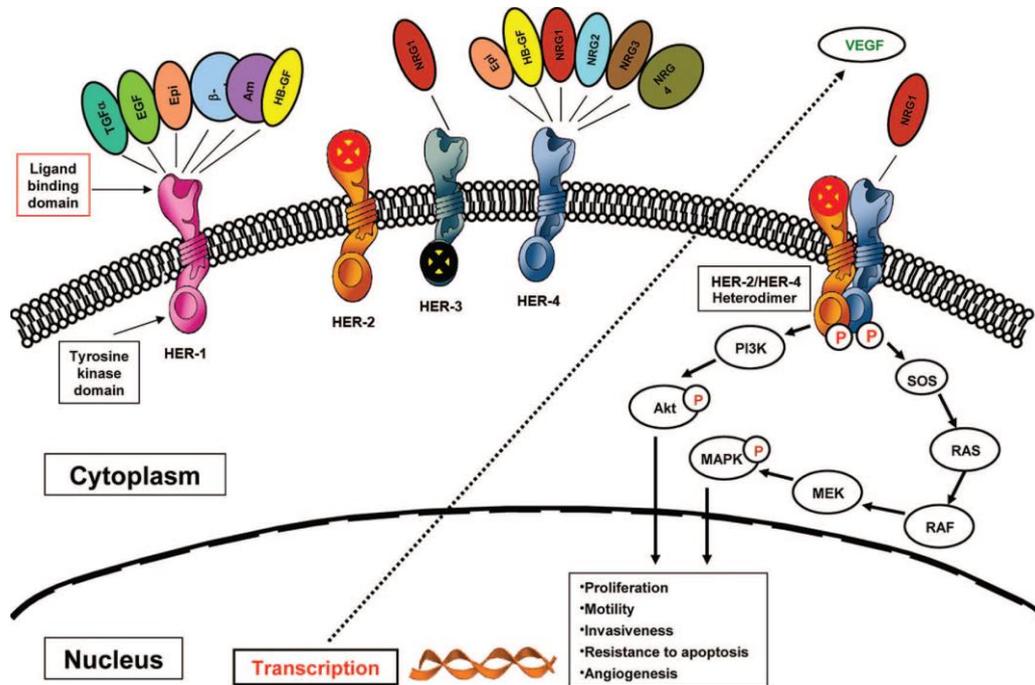


**Figure 16 : Voies de signalisation : cibles potentielles dans le cadre de la thérapie du cancer du sein.** Ces cibles sont l'EGFR, epidermal growth factor receptor; les GPCR: les récepteurs couplés aux protéines G ; les HER, human epidermal growth factor receptor ; l'IKK, inhibiteur de NF-κB ; la mTOR, mammalian target of rapamycin ; NF-κB, nuclear factor-κB ; TRAIL, tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand ; le VEGF, et le VEGFR. Source<sup>93</sup>.

### I.2.2.1.3. HER2/ErbB2 comme cible thérapeutique

La famille des récepteurs HER/ErbB (Human epidermal growth factor receptor) est une famille comprenant 4 récepteurs cellulaires de surface, HER1/ErbB1, HER2/ErbB2, HER3/ErbB3 et HER4/ErbB4<sup>94</sup>. Ces récepteurs possèdent un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire possédant une activité tyrosine

kinase (à l'exception d'HER3) (Figure 17). Ils interviennent dans la régulation de la croissance cellulaire, la différenciation et la survie.



**Figure 17 : La famille des récepteurs HER.** Cette illustration permet de visualiser les interrelations complexes entre les différents membres de la famille HER, et leurs voies de signalisation. L'activation des récepteurs HER peut soit stimuler soit inhiber la signalisation en aval d'autres voies biologiques. A noter que HER2 n'a pas de ligand connu et que HER3 ne possède pas de domaine à activité tyrosine kinase. Source<sup>27</sup>

L'activation des récepteurs nécessite trois composants : un ligand, un récepteur, et un partenaire de dimérisation. Quand un ligand spécifique se lie à son récepteur HER, il doit être associé à un récepteur de structure similaire ce qui conduit à leur dimérisation. Cet événement initie une cascade de phosphorylation et la transduction du signal qui permet la transcription des gènes spécifiques impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire<sup>95</sup>. Les récepteurs de la famille HER peuvent s'assembler en différentes combinaisons et former des homo- et hétérodimères. Tous les récepteurs HER interagissent avec un ligand spécifique à l'exception de HER2, pour lequel aucun ligand naturel n'a été identifié<sup>94-96</sup>. Cependant, un grand nombre de facteurs de croissance (tels que l'EGF, le TGF, l'amphireguline, l'heparine-binding, l'EGF-like growth factor, la bétacelluline, l'épiréguline et les neurégulines) ligands d'HER1, HER3 et HER4 peuvent déclencher une dimérisation rapide par le recrutement préférentiel d'HER2 pour la formation d'un complexe hétérodimère. Ces hétérodimères

contenant HER2 sont plus stables et induisent une transduction du signal ainsi qu'une stimulation plus forte et prolongée que les combinaisons de dimères ne comprenant pas HER2<sup>27,94,97,98</sup>.

L'amplification du gène d'HER2 et/ou la surexpression de la protéine a été identifiée dans 25 à 30% des cancers du sein<sup>97</sup>. L'amplification du gène codant pour HER2 dans le cancer du sein est associée à une augmentation de la prolifération, de la motilité cellulaire, de l'invasion tumorale, de la formation de métastases, de l'angiogenèse tumorale et à une réduction de l'apoptose<sup>99</sup>. Ces caractéristiques sont responsables d'un phénotype tumoral très agressif et corrélé à de faibles chances de survie pour ce type de patientes<sup>100</sup>. En conséquence, l'intérêt pour le développement de thérapies anti-HER2 a été particulièrement importante. Le Trastuzumab (Herceptin®, Genetech/Roche) est la première thérapie ciblée anti-HER2 approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) en 1998 pour le traitement des patientes surexprimant HER2 dans le cancer du sein métastatique<sup>101</sup>. C'est un anticorps monoclonal humanisé qui se lie avec une haute affinité au domaine extracellulaire de HER2 et permet l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales le surexprimant<sup>102</sup>. Le Trastuzumab montre un taux de réponse élevé chez les patientes atteintes de cancer du sein métastatiques HER-2 positifs<sup>103</sup>, que ce soit en combinaison et/ou après une chimiothérapie standard adjuvante<sup>104</sup>. Ce succès a ouvert la porte à d'autres stratégies thérapeutiques ciblées contre HER2 qui sont résumées dans la Table 6.

<b>Actif (Nom commercial)</b>	<b>Cible</b>	<b>Type</b>	<b>Mécanisme d'action</b>
<b>Trastuzumab (Herceptin)</b>	Anti- HER2	Anticorps monoclonaux humanisés	Liaison à HER2 bloquant les voies de signalisation en aval Favorise la dégradation par endocytose d'HER2
<b>Pertuzumab (Omnitarg)</b>	Anti- HER2	Anticorps monoclonaux humanisés	Liaison à HER2 et inhibition de sa dimérisation
<b>Trastuzumab (DMI)</b>	Anti- HER2	Immunoconjugué	Libération directe de l'agent de chimiothérapie dans le tissu cancéreux
<b>Lapatinib (Tyverb)</b>	Anti HER2 /EGFR	Inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe l'autophosphorylation des tyrosines kinases Bloque la transduction du signal intracellulaire d'EGFR et HER2
<b>Gefitinib (Iressa)</b>	Anti HER2 /EGFR	Inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe l'autophosphorylation des tyrosines kinases Bloque la transduction du signal intracellulaire d'EGFR et HER2
<b>Neratinib</b>	Anti HER2 /EGFR	Pan-erb inhibiteur de tyrosine kinase	Inhibe de manière irréversible l'autophosphorylation des tyrosines kinases et la transmission intracellulaire

**Table 6 : Nouvelles thérapeutiques ciblant HER2.** Celles indiquées dans le cadre du cancer du sein sont le Trastuzumab, le Lapatinib et l'Iressa. Source<sup>27</sup>.

### **I.2.2.2. Chimiothérapies ciblant l'angiogenèse tumorale**

L'angiogenèse tumorale tient une place importante dans la croissance, le maintien et la dissémination métastatique du cancer du sein, de ce fait elle constitue une cible thérapeutique particulièrement étudiée et exploitée depuis plusieurs années. De plus, les thérapies anti-angiogéniques induisent peu d'effets secondaires car contrairement aux cellules endothéliales intra-tumorales activées en permanence pour l'angiogenèse tumorale, les cellules endothéliales « normales » sont pour la plupart en état de quiescence<sup>105</sup>.

#### **I.2.2.2.1. Différentes stratégies d'inhibition de l'angiogenèse**

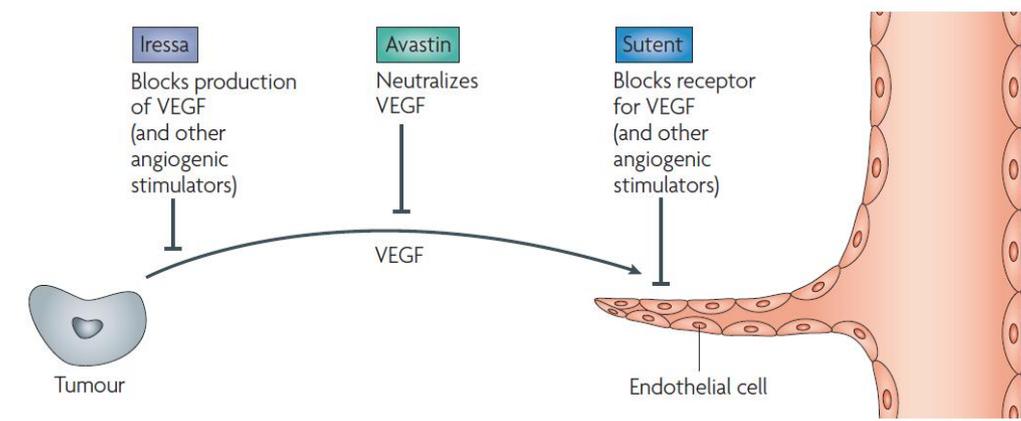
L'angiogenèse est un processus multi-étapes : chacune de ses étapes fait intervenir différents facteurs plus ou moins importants (Cf. Partie I.1.4.2. "L'angiogenèse tumorale"). Chacun de ses facteurs peut être considéré comme une cible thérapeutique potentielle. Cependant, la plupart des agents anti-angiogéniques développés et testés en clinique ciblent l'axe VEGF/VEGFR et ont pour but l'inhibition de l'activation des cellules endothéliales (CE).

Facteurs		Activités biologiques
<b>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</b>	(i) (ii) (iii) (iv) (v)	Favorise l'angiogenèse et la vasculogenèse Stimule la prolifération des CE microvasculaires Améliore la migration et le bourgeonnement des CE Inhibe l'apoptose des CE Augmente la perméabilité des CE
<b>Fibroblast growth factor (FGF)</b>	(i) (ii) (iii) (iv)	Stimule la prolifération des CE Favorise la formation des tubes vasculaires Favorise la migration des CE Promoteur important du remodelage vasculaire après une blessure
<b>Platelet-derived growth factor (PDGF)</b>	(i) (ii) (iii)	Augmente la stabilité de la paroi vasculaire Stimule la prolifération des cultures de péricytes et cellules musculaires vasculaires Augmente la synthèse d'ADN dans les CE des capillaires
<b>Transforming growth factor-<math>\beta</math> (TGF-<math>\beta</math>)</b>	(i) (ii) (iii) (iv) (v)	A faible dose, exerce une régulation positive des protéinases et des facteurs angiogéniques A forte dose, inhibe la croissance des CE, favorise la reformation de la membrane basale et stimule le développement des CMLs Stimule ou inhibe la croissance en tube des CE Signal des médiateurs inflammatoires comme les fibroblastes et les monocytes Améliore l'intégrité des parois vasculaires
<b>Integrin <math>\alpha</math>V<math>\beta</math>3</b>	(i) (ii) (iii) (iv)	Lie et active les MMP2 pour favoriser la dégradation de la matrice extracellulaire Améliore l'adhésion ces CEs, leur diffusion et leur migration Montre une activité accrue près des sites de blessures Situé aux extrémités des CE pendant le bourgeonnement des néovaisseaux
<b>Integrin <math>\alpha</math>V<math>\beta</math>5</b>	(i)	Interagit avec le VEGF pour favoriser l'angiogenèse
<b>VE cadherin</b>	(i) (ii) (iii) (iv)	Favoriserait le passage de petites molécules à travers l'endothélium Régule la croissance des CE par inhibition de contact Aide à prévenir l'apoptose des CE en promouvant le signal du VEGF Aide à stabiliser les branches et les pousses produites pendant l'angiogenèse
<b>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	(i) (ii)	Stimule l'angiogenèse <i>in vivo</i> Stimule la formation en tube des CE <i>in vitro</i>
<b>Transforming growth factor-<math>\alpha</math> (TGF-<math>\alpha</math>)</b>	(i) (ii)	Favorise la prolifération des CE Stimule l'angiogenèse <i>in vivo</i>
<b>Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)</b>	(i)	Aiderait à la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales en clivant la matrice extracellulaire

**Table 7 : Principaux facteurs participant à l'angiogenèse.** CE : Cellules endothéliales.  
Source<sup>106</sup>.

#### 1.2.2.2. Inhibition de l'activation des cellules endothéliales

La première approche consiste à **diminuer l'expression des facteurs de croissance et/ou des récepteurs**. Des oligonucléotides anti-sens neutralisant l'ARNm du VEGF ont été développés afin de diminuer l'expression du VEGF et ont montré un potentiel anti-angiogénique<sup>107</sup>. Un antisens neutralisant l'angiopoïétine-1 a notamment été testé *in vitro* sur des cellules tumorales de la lignée HeLa (cellules de cancer du col de l'utérus) et a montré une diminution marquée de la croissance tumorale<sup>108</sup>. Des protéines contenant les domaines extracellulaires des récepteurs (récepteurs solubles) ont été synthétisées afin de capturer le VEGF circulant et d'en diminuer la biodisponibilité ; par exemple le VEGF-Trap. Son affinité pour le VEGF est 100 fois supérieure à celle obtenue avec des anticorps monoclonaux. Il supprime la croissance tumorale et la vascularisation *in vivo*, conduisant à des tumeurs presque complètement avasculaires et à une diminution des métastases<sup>109</sup>. Un ribozyme synthétique (*Ribonucleic Acid Enzyme*, molécule d'ARN qui catalyse son propre clivage) anti-VEGFR-1 (RPI 4610/Angiozyme®) a été développé dans le but de bloquer la synthèse de ce récepteur et est actuellement en essais cliniques de phase II pour le cancer du sein et le cancer colorectal<sup>110</sup>.



**Figure 18 : Les trois mécanismes des inhibiteurs de l'angiogenèse ciblant le VEGF actuellement approuvés par la FDA.** L'Iressa bloque l'expression tumorale des facteurs angiogéniques. L'Avastin bloque l'interaction entre le VEGF et son récepteur. Enfin, le Sunitinib bloque la transduction du signal dans les cellules endothéliales. Source<sup>111</sup>.

Deuxièmement, des agents se fixant soit sur le facteur de croissance, soit sur le récepteur ont été élaborés afin **d'inhiber l'interaction entre le ligand et son récepteur**. Le

Bevacizumab (Avastin®) est le premier agent anti-angiogénique approuvé par la FDA pour le traitement des cancers colorectaux métastatiques aux Etats-Unis en 2004 ; puis en Europe l'année suivante<sup>112</sup>. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF. Il induit une diminution de la perfusion tumorale, de la densité des microvaisseaux, de la pression interstitielle et du nombre de progéniteurs circulants des cellules endothéliales. Un autre anticorps monoclonal a été élaboré, l'IMC-1C11. Il s'agit d'un anticorps chimérique de type IgG1 dirigé contre le VEGFR-2, qui bloque le lien entre ce récepteur et son ligand. Une étude de phase I chez 14 patients atteints d'un cancer colorectal métastatique a permis une stabilisation prolongée malgré la présence d'anticorps anti-chimériques chez sept patients<sup>113</sup>.

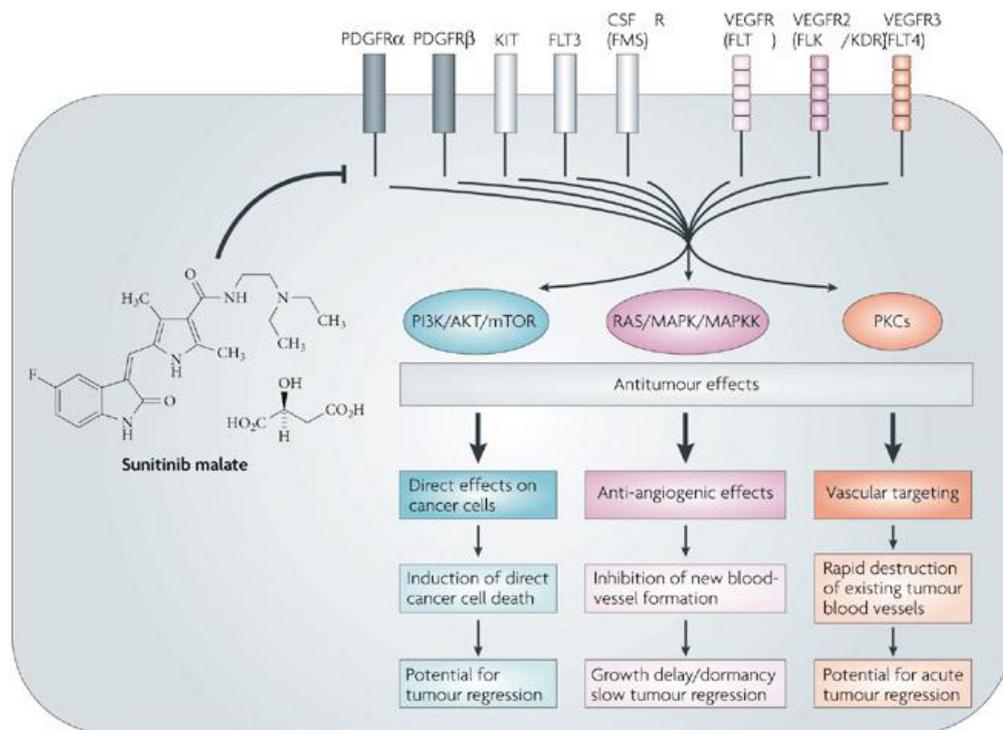
Enfin, des molécules agissent en aval de la transduction du stimulus angiogénique. Il s'agit de **petits inhibiteurs synthétiques de l'activité tyrosine kinase des récepteurs**. Nous pouvons citer, en premier lieu, le Semaxanib (SU5416) qui est un dérivé de l'indoline-2-one. Ce composé bloque sélectivement l'autophosphorylation du récepteur VEGFR-2. Chez l'animal, il présente une activité antitumorale et permet d'induire l'apoptose des cellules endothéliales<sup>114</sup>. Cependant, suite aux nombreux incidents (embolies pulmonaires et infarctus du myocarde notamment) survenus lors d'essais cliniques, ceux-ci ont été interrompus. Un analogue de cette molécule, le Sunitinib (SU11248, Sutent®) lui a été préféré. En 2007, il fut approuvé par la FDA pour le traitement contre le cancer du rein<sup>115</sup>. Actuellement, de nombreuses études cliniques démontrent son efficacité dans le cadre du cancer du sein<sup>116</sup>. Pour des raisons que nous exposerons plus loin, nous avons été amenés à utiliser cette molécule.

#### **I.2.2.2.3. Le Sunitinib**

Le Sunitinib (SU) est un inhibiteur de tyrosine kinase à cibles multiples et qui possède une activité anti-angiogénique et antitumorale grâce à son inhibition sélective des récepteurs VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR $\alpha$ , PDGFR $\beta$ , Kit, FLT3 (fms-related tyrosine kinase) et CSF1 (Colony stimulating factor)<sup>117</sup> (Figure 19).

Le SU a été identifié au cours d'un screening de molécules visant à identifier des molécules inhibitrices de VEGFRs et PDGFRs, qui comme nous l'avons vu dans la Partie I.2.2.1.

"Chimiothérapie ciblant des facteurs de croissance dans le cancer du sein", ont un rôle important dans l'angiogenèse tumorale<sup>118</sup>.



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 19 : Propriétés du Sunitinib malate.** Le Sunitinib malate interagit de manière sélective avec les sites de liaison à l'ATP des tyrosines kinases des récepteurs VEGFR, PDGFR, KIT, FLT3, CSF1R. L'inhibition de ces récepteurs a de multiples effets sur les processus cellulaires incluant : la survie cellulaire, la migration et la croissance des cellules endothéliales, la perméabilité vasculaire, le recrutement des CMLs et péricytes ainsi que la lymphangiogenèse. Source<sup>118</sup>.

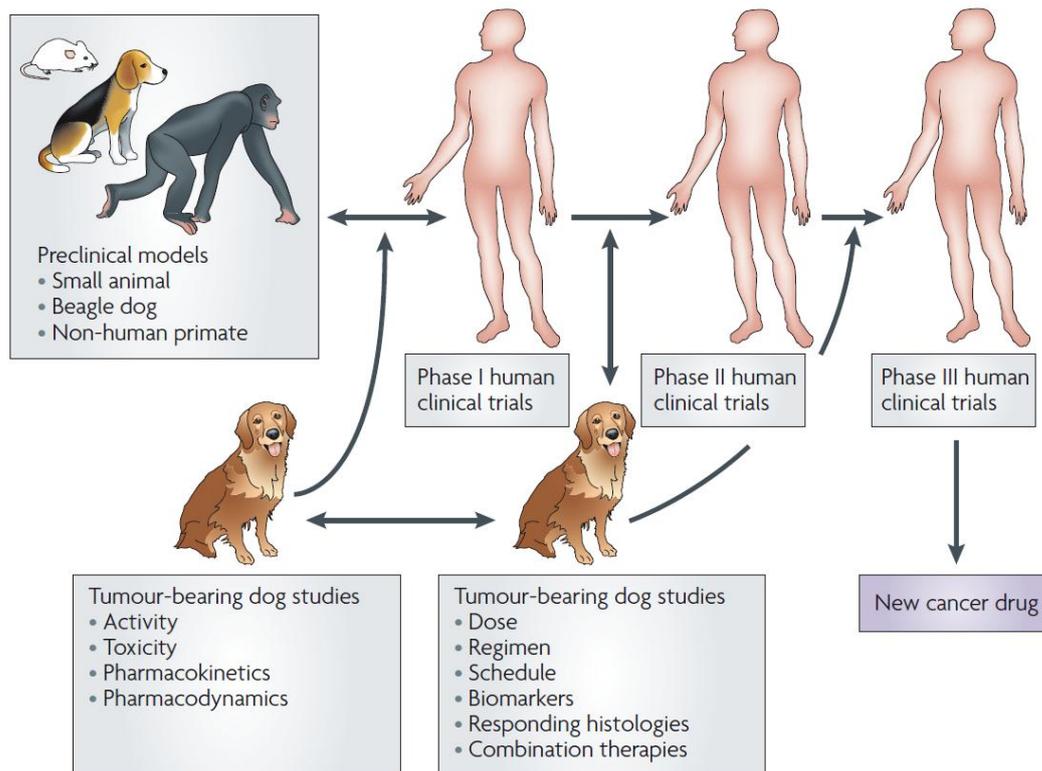
#### 1.2.2.2.4. Avenir des thérapies anti-angiogéniques ciblées

Malgré les résultats encourageants obtenus avec ces thérapies ciblées dans le cadre du cancer du sein (anticorps monoclonaux ou inhibiteurs de récepteurs à tyrosine kinase), il semble que l'avenir réside dans la combinaison de plusieurs traitements ciblés alliés aux chimiothérapies. Dans plusieurs études de phase II et III, il a été démontré la supériorité des combinaisons d'agents anti-angiogéniques à des agents de chimiothérapies conventionnels tels que le PTX ou le Docetaxel par rapport au traitement anti-angiogénique seul<sup>90,119,120</sup>.

## **I.3. Le cancer du sein chez l'animal de compagnie**

### **I.3.1. Intérêt de l'implication des animaux de compagnie dans la recherche contre le cancer du sein**

Les rongeurs ont été d'une grande utilité dans la recherche contre le cancer du sein et le cancer en général. Mais les modèles induits chez ces espèces ne sont que des approximations de la réalité. Leur remplacement par des espèces plus proches telles que le cochon ou le chien pourrait permettre d'obtenir des résultats précliniques plus adaptés bien que plus onéreux. Paolini met en avant les progrès fait dans ce domaine<sup>121</sup>. Les tumeurs spontanées de nos animaux de compagnie, en particulier chez la chienne, montrent des similarités avec l'espèce humaine sur le plan clinique et biologique. En effet, ils sont exposés au même environnement et, de ce fait aux mêmes carcinogènes que les humains<sup>122</sup>. A l'heure actuelle l'utilisation d'animaux de compagnie pour les tests précliniques reste anecdotique bien qu'en légère augmentation depuis les trente dernières années<sup>123</sup>. La prise en charge des cancers en médecine vétérinaire a considérablement évolué au cours des vingt dernières années, profitant des connaissances de la médecine humaine. Au départ, les propriétaires d'animaux attendaient le plus souvent une guérison de l'animal mais les traitements palliatifs prennent actuellement une importance considérable, sous réserve du maintien de la qualité de vie<sup>124</sup>. Les études translationnelles sur nos chiens de compagnie représentent un véritable intérêt. Elles offrent une approche intermédiaire entre les essais sur les modèles précliniques (rongeurs, race de chiens d'élevage et primates) et les essais cliniques sur l'homme (Figure 20). De plus, l'intérêt affectif augmentant pour nos animaux de compagnie, les enjeux financiers dans ce domaine deviennent eux aussi plus importants<sup>125</sup>.



**Figure 20 : Possibilité de recherche translationnelle, intérêt de la thérapie vétérinaire pour la thérapie humaine.** Source<sup>121</sup>.

### 1.3.2. Chez le chien (*Canis Lupus familiaris*)

Les cancers les plus fréquents chez la chienne sont, comme chez la femme, les cancers mammaires. Ainsi, les tumeurs mammaires représentent 40% de toutes les tumeurs détectées chez la chienne<sup>126</sup>. Les découvertes récentes en matière de cancer mammaire chez la femme et chez la chienne permettent de reposer la question de l'intérêt du carcinome mammaire de la chienne comme modèle pour le cancer du sein<sup>127</sup>.

Les carcinomes constituent la majorité des cancers, les sarcomes sont minoritaires<sup>128</sup>. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a établi une classification histologique des tumeurs mammaires chez le chien et le chat. Elle est présentée dans la Table 8 pour les tumeurs malignes. Cette classification permet de trier les tumeurs selon leur potentiel de malignité<sup>129</sup>. La fréquence de chacun des différents types de cancer se fonde à ce jour sur des compilations de résultats obtenus dans différents laboratoires d'histopathologie vétérinaire. Les carcinomes sont les plus fréquents (85 à plus de 90% des prélèvements). Les sarcomes et les carcinosarcomes sont minoritaires (moins de 10% respectivement)<sup>129</sup>.

HISTOLOGICAL CLASSIFICATION OF CANINE MAMMARY TUMOURS	
BENIGN TUMOURS	Adenoma
	Simple adenoma
	Complex adenoma
	Basaloid adenoma
	Fibroadenoma
	Low-cellularity fibroadenoma
	High-cellularity fibroadenoma
	Benign mixed tumour
	Duct papilloma
	<hr/>
MALIGNANT TUMOURS	Noninfiltrating (in situ ) carcinoma
	Complex carcinoma
	Simple carcinoma
	Tubulopapillary carcinoma
	Solid carcinoma
	Anaplastic carcinoma
	Special types of carcinomas
	Spindle cell carcinoma
	Squamous cell carcinoma
	Mucinous carcinoma
	Lipid-rich carcinoma
	Sarcoma
	Fibrosarcoma/ Osteosarcoma/ Other sarcomas
Carcinosarcoma	
Carcinoma or sarcoma in benign tumour	

**Table 8 : Classification histologique des tumeurs mammaires canines. Source<sup>130</sup>.**

De la même manière que chez la femme, les cancers canins mammaires, sont hautement hétérogènes en termes de morphologie et de comportement biologique<sup>131</sup>. Une étude de 2008 a permis d'évaluer une série de carcinomes mammaires selon la classification humaine (basée sur les profils d'expression génique)<sup>21</sup>. De manière similaire aux cancers du sein humains, les cancers canins ont pu être classés selon les différents sous-types : luminal-A, luminal-B, basal et surexprimant HER2.

Comme chez la femme, la glande mammaire est un tissu hormono-dépendant chez la chienne. Les cellules épithéliales expriment les récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone, à la prolactine et aux facteurs de croissance de la famille EGF. L'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone est un signe d'hormono-dépendance et est considérée comme un facteur de bon pronostic. Environ 75 à 80% des cancers du sein chez la femme expriment le récepteur aux œstrogènes et 40 à 50% pour la progestérone. Chez la chienne, ces fréquences sont de 50% pour le récepteur aux œstrogènes<sup>132</sup> et 40% pour le récepteur à la progestérone<sup>133</sup>. La présence des récepteurs aux œstrogènes chez la chienne serait moins fréquente. Cependant, il faut tenir compte du fait que ces résultats ont été obtenus sur un plus petit nombre de cas que chez la femme. De plus, les animaux ne

subissent pas de contrôles réguliers contrairement à la femme (palpation, mammographie). Ainsi lorsque les cancers sont diagnostiqués ils sont souvent à un stade plus avancé.

### **I.3.3. Chez le chat (*Felis silvestris catus*)**

La carcinome mammaire est le troisième cancer félin derrière les leucémies et les néoplasmes cutanés<sup>134</sup>. Les cancers mammaires félines sont généralement très infiltratifs, métastasants et n'expriment pas les récepteurs hormonaux dans la plupart des cas<sup>111</sup>. Ils ont des caractéristiques communes avec les cancers du sein humain agressif n'exprimant pas les récepteurs hormonaux<sup>135</sup>. Les informations utilisées en médecine vétérinaire pour établir un pronostic sont : la taille de la tumeur, la présence de métastases ganglionnaires, le grade histologique, l'expression des marqueurs de prolifération et le statut des récepteurs hormonaux<sup>136</sup>. La plupart des tumeurs mammaires félines (plus de 90%) sont des adénocarcinomes, même si d'autres types de carcinomes ou des sarcomes peuvent être rencontrés. Les tumeurs mammaires félines croissent rapidement et se disséminent aux nœuds lymphatiques régionaux et aux poumons plus rapidement que chez la chienne. Ces tumeurs ont la particularité d'être mal circonscrites, souvent ulcérées. La plupart des tumeurs féline (80%) n'expriment pas les récepteurs aux œstrogènes. Ainsi, ces animaux semblent de bons modèles d'étude des cancers du sein humain hormono-indépendants<sup>137</sup>.

## II. LES MODES DE LIBERATION PROLONGEE DES MOLECULES DE CHIMIOETHERAPIES

La libération prolongée de molécules de chimiothérapie a été ces dernières années, un objectif assez couru car certaines formulations - nous l'avons vu avec le Taxol® - étaient loin d'être optimales. La libération prolongée éviterait les injections répétées et permettrait d'avoir des concentrations circulantes plus constantes. Pour le cas du Taxol®, plusieurs formes galéniques pour l'administration intraveineuse ou la voie orale ont été développées. Ces stratégies incluent une modification structurelle du PTX, l'incorporation à de nouveaux solvants/ajout de co-solvant, ou encore sa complexation sous forme de pro-drogues ou à divers agents de relargage (lipides, polymères...).

## II.1. Les multiples possibilités de relargage prolongé du Paclitaxel

Pour de nombreuses équipes de recherche trouver une nouvelle formulation pour le PTX, sans Cremophor® a été un véritable challenge. La Table 9 regroupe les formulations les plus citées dans la littérature.

Dénomination	Stratégie de libération	Mode d'administration	Stade de développement	Références
<b>Nab-PTX (Abraxane®)</b>	Couplage du PTX à l'albumine, formation de <i>nanoparticules</i>	I.V.	AMM cancer sein métastatique	138
<b>Docosahexanoic acid (DHA)-PTX (Taxoprexin®)</b>	Conjugaison du PTX à un acide gras naturel, l'acide docosahexaénoïque (DHA). <i>Prodrogue</i>	I.V.	Phase II cancer du foie Phase III mélanome	139
<b>PTX polyglumex (Xyotax®, Opaxio®)</b>	Conjugaison d'acide polylactique (PLA) et du PTX. <i>Prodrogue</i>	I.V.	Phase II sein, ovaire, prostate Phase III poumon	140
<b>NK105</b>	Incorporation du PTX dans un <i>système micellaire</i> à base d'un copolymère de polyéthylène glycol (PEG) et polyaspartate	I.V.	Phase II cancer gastrique	141
<b>Paclimer™</b>	Incorporation du PTX dans un polymère biodégradable de polyphospho-ester p(DAPG-EOP), sous forme de <i>microsphères</i>	I.P. ou Intra-tumoral en phase préclinique	Phase I cancer des ovaires	142
<b>Oncogel®</b>	Dépôt de PTX injectable. Incorporation dans un copolymère PEG-PLGA	Local	Phase III	143

**Table 9 : Nouvelles formes galéniques, non exhaustives, du Paclitaxel et leurs avancées en clinique.** I.V : Voie intraveineuse, I.P. : voie intra péritonéale.

## II.2. Formes galéniques du Paclitaxel les plus avancées dans leur développement

### II.2.1. Abraxane®

#### II.2.1.1. Description

Comme la plupart des molécules hydrophobes, le Paclitaxel se lie à l'albumine dans la circulation sanguine. Le coupler directement à l'albumine pour le rendre soluble sans surfactant a conduit au développement de l'Abraxane®<sup>138</sup>. L'Abraxane® ou nanoparticules d'albumine liées au PTX (nab-P; Abraxis BioScience, Bridgewater, NJ, USA) est une formulation du PTX sans CrEI avec une activité démontrée chez des patients atteints de cancer du sein que ce soit à un stade avancé ou en traitement néoadjuvant. L'Abraxane® a démontré une meilleure activité et un meilleur profil de sécurité en comparaison aux solvants déjà utilisés pour l'administration de PTX<sup>144,145</sup>. L'Abraxane® a été approuvée par la Food Drug and Administration (FDA) en janvier 2005 et par la European Medicines Agency (EMA) en 2008 pour le traitement du cancer du sein métastatique sur la base d'un essai clinique de phase III dans lequel l'Abraxane® a montré une efficacité supérieure au PTX (Taxol®; Bristol Myers Squibb).

#### II.2.1.2. Pharmacocinétique

La concentration d'albumine dans le nab-P est d'environ 3-4%, ce qui est similaire à la concentration sanguine de PTX<sup>88</sup>. Les particules de PTX stabilisées par l'albumine humaine ont une taille d'environ 130 nm. Une fois injectée dans la circulation sanguine ces particules se dissolvent rapidement en complexes de plus petites tailles (environ 10 nm), ce qui permet leur diffusion dans la circulation sans risque d'obstruer un capillaire. Cette formulation, permet au PTX d'être biodisponible dès son injection dans la circulation. Lors d'une comparaison de distribution de nab-P et de Taxol® de 20 mg/kg chez un animal développant une tumeur MX-1, il a été démontré que les concentrations intra-tumorales de PTX étaient 33% supérieures pour le nab-P<sup>146</sup>. Une étude de pharmacocinétique comparative a été réalisée sur 24 patients traités au Taxol® ou au nab-P aux mêmes doses et selon le même schéma d'administration<sup>146</sup>. Ces données ont mis en évidence une clairance et un volume de

distribution plus important pour le PTX issu du nab-P. En ce qui concerne les données métaboliques obtenues dans cette étude pharmacocinétique, les demi-vies d'élimination sont similaires pour les deux formulations.

### **II.2.1.3. Efficacité préclinique et clinique**

L'équipe de Desai et al.<sup>147</sup> a comparé l'efficacité du nab-P et du Taxol®, à doses équivalentes, à l'aide de modèles animaux et a montré que le groupe traité au nab-P était plus susceptible d'avoir une régression complète, de plus longue période sans rechute et une survie prolongée.

### **II.2.1.4. Avantages de l'Abraxane® par rapport au Taxol®**

L'Abraxane® possède une meilleure biodisponibilité, une meilleure efficacité et engendre moins d'effets secondaires que le Taxol®. De plus, l'albumine est connue pour favoriser la transcytose des composants libres ou liés du plasma vers le compartiment intracellulaire. Ce processus est initié par la liaison de l'albumine à un récepteur de surface (la glycoprotéine de 60 kDa (gp60)) qui en réponse, active une protéine intracellulaire (la caveolin-1). L'activation de la caveolin-1 conduit à l'invagination de la membrane cellulaire pour former des vésicules transcytotiques appelées cavéoles, ces dernières transportent l'albumine (et le PTX qui lui est lié) à travers les cellules endothéliales et l'espace interstitiel<sup>148,149</sup>. De plus, l'ostéonectine, ou secreted protein acid rich in cystein (SPARC), qui possède une homologie de séquence avec la caveoline-1, lie aussi l'albumine. La surexpression de la SPARC dans certains cancers (sein, poumon et prostate), pourrait expliquer pourquoi l'albumine s'accumule dans les tumeurs et ainsi facilite l'accumulation des drogues qui lui sont liées. L'absence de micelles de CrEI séquestrant le PTX et inhibant son transport médié par l'albumine, pourrait expliquer les différences de concentration intra-tumorales du Taxol® et de l'Abraxane®. De plus, la liaison aux cellules endothéliales pour le nab-P permet d'augmenter l'effet anti-angiogénique du PTX, d'où une meilleure réponse antitumorale<sup>150,151</sup>.

## II.2.2. Prodrogue macromoléculaire : le Xyotax®

### II.2.2.1. Description

Le Xyotax® (Paclitaxel polyglumex ou CT-2103), développée par la compagnie Cell Therapeutics (CTI), est une prodrogue formée d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) et de PTX<sup>152,153</sup>. Le PLGA, un peptide hydrophile, polyanionique hautement chargé, a été choisi comme squelette du polymère car il est biodégradable. Contrairement aux polymères non dégradables, ses métabolites peuvent entrer dans le cycle cellulaire normal et il n'est pas excrété par les reins. La conjugaison entre les deux est réalisée au moyen d'une liaison ester, il en résulte une grande stabilité. Le poids moléculaire médian de la prodrogue est de 80 kDa et le contenu en PTX est 37% m/m. La conjugaison du PTX permet d'améliorer significativement sa solubilité aqueuse. Suite à son administration IV, la prodrogue s'accumule de façon passive dans le tissu tumoral. Il est ensuite internalisé par les cellules tumorales et le PTX est libéré sous l'action des enzymes lysosomales (cathepsine B surtout).

### II.2.2.2. Efficacité préclinique et clinique

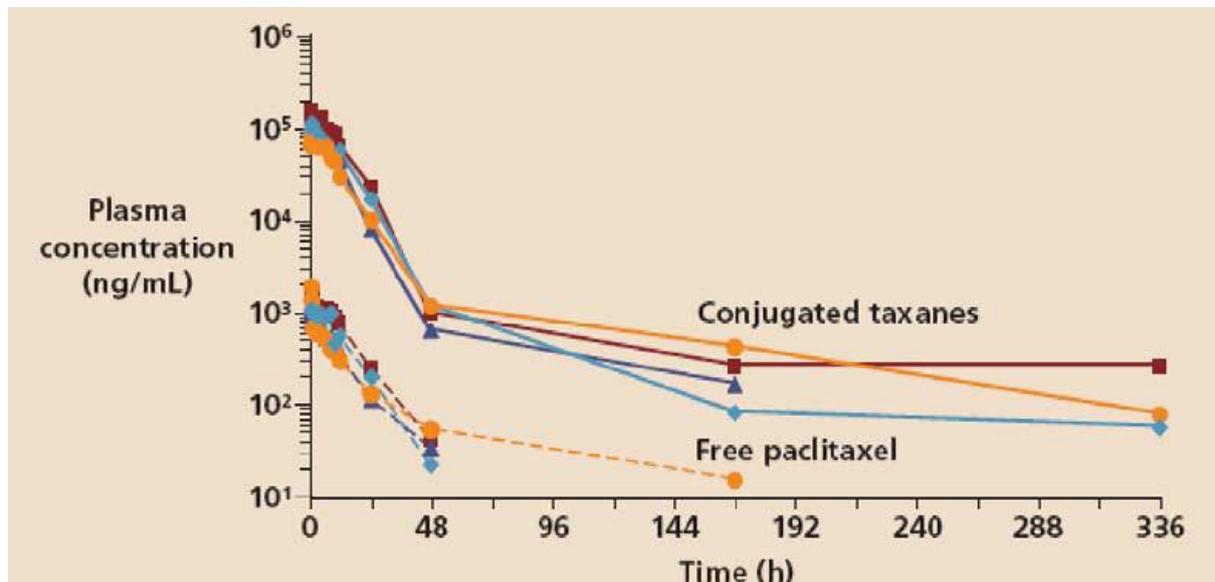
Le Xyotax® possède une activité thérapeutique significative sur des modèles animaux de xénogreffes<sup>154,155</sup>. Sa dose maximale tolérée est de 160 à 200 mg/kg chez des animaux immunocompétents et de 120 à 150 mg/kg chez des animaux immunodéficients<sup>140</sup>.

En clinique humaine, le Xyotax® est administré par perfusion de 10 min à intervalles de 3 semaines. La dose maximale tolérée déterminée lors des études de phases I est de 235 mg/m<sup>2</sup><sup>156</sup>. Lors d'études de phase II, le Xyotax® fut administré à des patients atteints de cancers du sein, de l'ovaire et de la prostate, et a démontré des taux de réponses comparables à ceux du Taxol®. Des études de phase III ont aussi été effectuées chez des patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules démontrant sa supériorité d'effets par rapport au Taxol®.

### II.2.2.3. Pharmacocinétique

Le PTX libre est progressivement relargué du Xyotax® et sa concentration plasmatique diminue dans le temps de manière parallèle à celle du Taxol® (Figure 21). Ceci suggère que

sa distribution et son élimination dépendent de la libération du PTX en fonction du polymère.



**Figure 21 : Concentrations plasmatiques de Paclitaxel conjugué au Xyotax® et libre après une administration chez quatre patients représentatifs des groupes. Source<sup>140</sup>.**

Le Xyotax® possède une demi-vie quatre fois plus élevée que le PTX libre. Son volume de distribution est bas entre 1,3 et 2,9 L/m<sup>2</sup> suggérant qu'il se distribue majoritairement dans le plasma<sup>140</sup>. Au cours des expériences sur les animaux, il a été montré que la distribution tissulaire du PTX a été plus rapide avec le PTX libre, mais que la dose de PTX à laquelle la tumeur a été exposée est plus importante avec le Xyotax®.

#### II.2.2.4. Avantage par rapport au Taxol®

En plus de tous les avantages liés à la non-utilisation de CrEI, l'utilisation du Xyotax® permet l'obtention d'une phase de relargage prolongée du PTX et une plus haute concentration plasmatique. Si l'on teste l'efficacité du Xyotax® et du PTX à leurs doses maximales tolérées respectives, le Xyotax® est plus efficace et est capable de soigner des groupes d'animaux alors que le Taxol® ne fait que retarder la croissance tumorale<sup>157</sup>. Globalement, le Xyotax®, qui constitue une formulation dépourvue de CrEL, a une incidence significativement plus faible de certains effets indésirables, tels l'alopécie, les nausées et vomissements, ainsi que les réactions d'hypersensibilité et ne requiert pas de prémédication de routine<sup>153</sup>.

## II.2.3. OncoGel™

### II.2.3.1. Description

L'OncoGel™ est une formulation de PTX en ReGel (sans CrEI). Elle a été conçue en vue d'une administration de PTX locale pour le traitement de tumeurs solides afin de mieux cibler la cytotoxicité sans la toxicité systémique associée à l'injection intraveineuse de PTX<sup>143</sup>. Le ReGel™ est un système de relargage contrôlé, sensible à l'environnement : il est thermosensible, composé d'un copolymère d'acide polylactique-co-glycolique (PLGA) et de PEG. Sa structure de base est PLGA-PEG-PLGA<sup>158</sup>. Il a la particularité d'être peu visqueux et soluble dans l'eau entre 2 et 15°C et de former un gel biodégradable de libération contrôlée insoluble dans l'eau à la température du corps (37°C). L'OncoGel™ permet un relargage de PTX continu pendant 6 semaines. Une fois libéré, le PTX se lie aux tissus proches du site d'injection, maintenant une concentration locale élevée<sup>143</sup>.

### II.2.3.2. Efficacité clinique et préclinique

L'efficacité de l'OncoGel™ en monothérapie a été démontrée sur 3 modèles animaux différents : un modèle de cancer du sein ectopique de souris xénogreffées (MDA-MB-231), un modèle de tumeur du système nerveux central ainsi qu'un modèle de gliome chez le rat<sup>158-160</sup>.

Dans le modèle de cancer du sein ectopique de souris xénogreffées (MDA-MB-231), l'efficacité de l'OncoGel™ a été comparé à celle du Taxol®. Une seule injection d'OncoGel™ de 10 à 60 mg/kg de PTX, permet l'obtention de résultats similaires à des injections de Taxol® quotidiennes à 20 mg/kg pendant 5 jours<sup>158</sup>. Pour le modèle de tumeur du système nerveux central et de gliosarcome, l'OncoGel™ permet l'augmentation du temps de survie des animaux par rapport aux témoins non traités<sup>143</sup>.

En ce qui concerne les phases cliniques, la dose d'OncoGel™ allant jusqu'à 2.0 mg de PTX par cm<sup>3</sup> de volume tumoral était plutôt bien tolérée. C'est-à-dire qu'aucun effet indésirable sérieux n'a été rapporté aux cours de ces études<sup>143</sup>.

### II.2.3.3. Pharmacocinétique

La pharmacocinétique de l'OncoGel™ a été évaluée avec une formulation de 6,3 mg de PTX/mL. Les valeurs ADME (Absorption, Distribution, Métabolisation, Elimination) ont été réalisées après l'administration de l'OncoGel™ (avec du PTX marqué au <sup>14</sup>C) en intra-tumoral dans un modèle de cancer du sein chez la souris xénotransgénée sur 50 jours<sup>158</sup>. La concentration intra-tumorale en <sup>14</sup>C, correspondant à la quantité de PTX, a diminué progressivement pendant 6 semaines avec pour valeur de demi-vie 21 jours. Moins de 0,1% de la quantité de PTX initiale est retrouvée dans le sang ou dans les autres tissus, indiquant une distribution locale exclusive. Les niveaux de PTX mesurables ont été retrouvés à une distance comprise entre 30 et 50 mm du dépôt<sup>143</sup>.

### II.2.3.4. Avantage par rapport au Taxol®

L'utilisation de l'OncoGel™ permet d'obtenir une meilleure efficacité anti-tumorale en réduisant les effets secondaires liés à l'excipient principal du Taxol® : le CrEI. Sa formulation liquide à température ambiante facilite son injection et sa capacité à se solidifier à 37°C lui permet de rester localiser sur son site d'implantation. Contrairement au Taxol®, l'OncoGel™ est administré de manière locale. Ce mode d'administration favorise l'efficacité anti-tumorale en augmentant la concentration de PTX sur le site tumorale. Ainsi l'impact du PTX sur les tissus sains est réduit.

## II.3. Les hydrogels : outils de libération contrôlée de chimiothérapie

Les premiers scientifiques à s'intéresser aux hydrogels ont été Langer et Folkman<sup>161</sup>, ces derniers ont démontré à travers leurs travaux que la libération contrôlée des médicaments avait un impact positif sur la thérapeutique. Ce concept a été une source d'intérêt dans toutes les branches de la médecine, mais aussi d'autres domaines tels que l'agriculture ou encore l'alimentation<sup>162</sup>. La libération contrôlée est un concept qui regroupe tout système permettant d'exercer un contrôle spatial et/ou temporel d'un principe actif.

Les avantages des systèmes de relargage prolongé sont multiples. En effet, ils permettent:

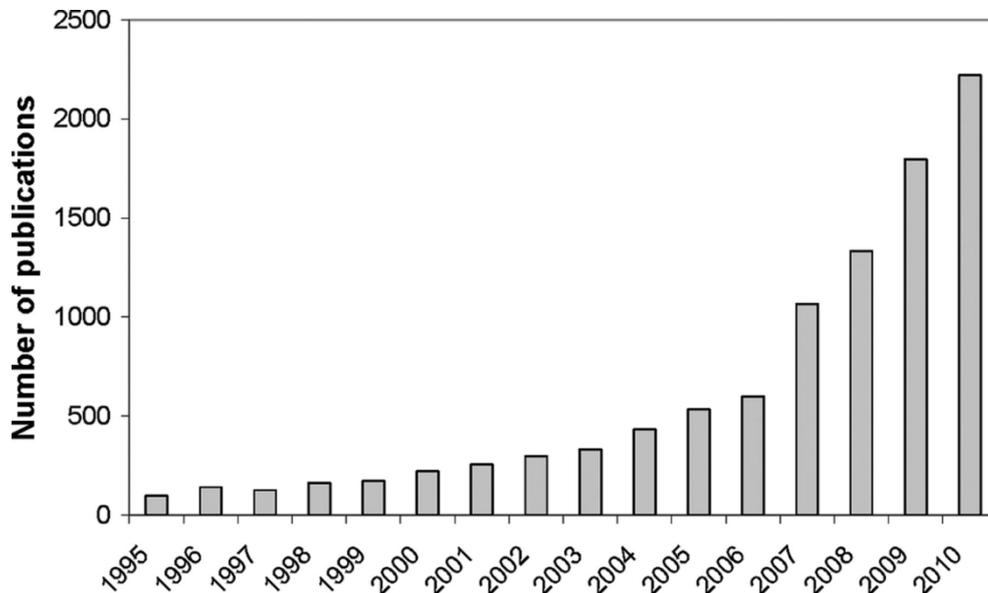
- le maintien prolongé de la concentration thérapeutique du médicament,
- une diminution des effets secondaires indésirables par ciblage du médicament à un type cellulaire,
- une diminution de la dose requise pour l'action thérapeutique,
- une meilleure tolérance par les patients de la posologie,
- un outil approprié pour l'administration de biopharmaceutiques ayant une courte demi-vie *in vivo* (protéines et peptides).

Les polymères sont à la base du concept de libération contrôlée<sup>162</sup>. Au sein des polymères, un groupe va nous intéresser tout particulièrement, celui des hydrogels.

### II.3.1. Description/Définition des hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels constitués de polymères dans lesquels sont présents des domaines ou des groupes hydrophiles hydratés dans un environnement aqueux. Les premières applications des hydrogels datent des années 60 lorsque Witcherle et Lim en 1960<sup>163</sup> introduisent l'utilisation d'un hydrogel pour la fabrication de lentilles de contact : l'hydroxyéthyl de méthacrylate (HEMA). Depuis, l'utilisation de ces biomatériaux de type hydrogel hydrophile et biocompatible s'est largement diversifiée. En 1980, Lim et Sun ont utilisé des microcapsules d'hydrogel d'alginate pour l'encapsulation de cellules, puis en 1989 l'équipe de Yannas proposait un hydrogel à base de collagène comme pansement artificiel pour les brûlures. Les nombreux domaines d'applications des hydrogels font que

leur intérêt augmente au fil des années. En effet, le nombre de publications qui leur sont consacrés est en constante augmentation : de 50 publications annuelles dans les années 1970, nous arrivons à plus de 2000 en 2010 (Figure 22).



**Figure 22 : Ensemble des publications relatives aux hydrogels ces 15 dernières années.**  
Source<sup>164</sup>.

Un grand nombre de définitions des hydrogels existe, la définition la plus couramment employée est celle fournie par Peppas et al. en 2000<sup>165</sup>. En accord avec cette dernière, un hydrogel gonfle en présence d'eau. Sa structure est polymérique et peut contenir :

- des liaisons covalentes produites par la réaction d'un ou plusieurs comonomères,
- une liaison physique liée à l'enchevêtrement des chaînes,
- une association de liaisons incluant des liaisons hydrogènes ou des interactions de Van der Waals entre les chaînes,
- des cristallites.

Les hydrogels peuvent être classés dans différentes catégories en fonction de différents paramètres dont : leur méthode de préparation, leur charge globale, leurs caractéristiques mécaniques et structurelles. Sur le critère de la méthode de préparation, les homopolymères et les copolymères doivent être distingués. Le critère de charge globale permet la séparation en trois sous-groupes : neutre, anionique et cationique, en fonction de la nature des blocs de polymères composant l'hydrogel. Enfin, il est possible de les classer en fonction de leur structure physique : amorphe, semi-cristalline, liée à l'hydrogène,

supramoléculaire et hydrocolloïde. Le plus fréquemment, ils sont divisés en deux grandes familles : les gels chimiques et les gels physiques, aussi désignés sous les termes de gels irréversibles et gels réversibles. La différence entre ces deux familles réside dans la nature des liaisons qui constituent les réticulations : liaisons covalentes dans le premier cas et liaisons secondaires réversibles dans le second<sup>166</sup> (hydrogène, Van der Waals, ioniques, hydrophobes...).

Les hydrogels forment une matrice qui protège le principe actif de la dégradation et de l'inactivation : sa forte hydrophilicité permet l'incorporation de substances hydrosolubles et lui confère un caractère biocompatible. L'ajout de groupements hydrophobes de type PLA/PLGA, permet aux hydrogels d'étendre leur champs. Ainsi, les molécules amphiphiles ou hydrophobes telles que le PTX peuvent aujourd'hui être incorporées dans ce type de formulations.

### **II.3.2. Hydrogels à base de polymères naturels**

Les polymères naturels sont extraits de ressources naturelles abondantes et la plupart d'entre eux possède une excellente biocompatibilité et leurs produits de dégradation ne sont ni toxiques, ni immunogéniques<sup>167</sup>. Parmi les polymères naturels on distingue les polysaccharides (agarose, alginate, acide hyaluronique, chitosan, dextran...) et les polymères à base de protéines (collagène, albumine, gélatine...) (Table 10). Les polysaccharides interagissent avec les cellules vivantes et possèdent une excellente hémocompatibilité, alors que les polymères à base de protéines forment des amas qui ressemblent à la matrice extra cellulaire et donc, qui retiennent les molécules libérées sur le site d'administration<sup>168</sup>. Néanmoins, les polymères naturels ont aussi quelques désavantages comme leur méthodes de purification qui peuvent être compliquées, leur immunogénicité, la possibilité de transmettre des maladies en fonction de leur organisme d'origine, et les variations d'un lot à l'autre<sup>169</sup>.

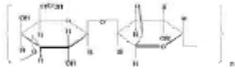
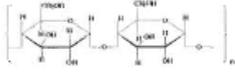
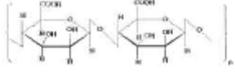
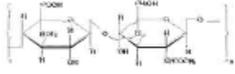
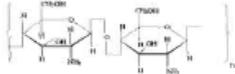
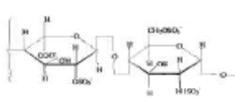
Structure	Polymère	Charge
	Agarose	Non-ionique
	Amylose	Non-ionique
	Alginate	Anionique
	Acide hyaluronique	Anionique
	Chitosan	Cationique
	Cellulose	Non-ionique
	Héparine	Anionique
	Gélatine	Ampholyte
	Albumine	Ampholyte

Table 10 : Polymères naturels préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogel. Source<sup>170</sup>.

### II.3.3. Hydrogels à base de polymères synthétiques

Les polymères naturels n'étant pas forcément adaptés à toutes les utilisations, l'homme s'est mis à synthétiser des polymères pour répondre à ses attentes. Comme les polymères synthétiques peuvent être adaptés ou modifiés sur mesure afin de proposer les propriétés mécaniques ou chimiques adaptées à un besoin spécifique, ils sont communément utilisés pour le développement des nouveaux systèmes de relargage de médicaments. De plus, il est important de noter que contrairement aux polymères naturels, les polymères synthétiques ont très peu de chance d'être immunogènes ou bien de transmettre une maladie. D'un autre côté, de part leur nature synthétique, ces polymères entraînent souvent des réactions inflammatoires et ont des faibles taux de clairance. La Table 11 constitue une vision non exhaustive des polymères synthétiques utilisés pour la synthèse d'hydrogels.

Polymère	Structure	Ionicité
Poly (éthylène glycol) « PEG »	$H(OCH_2CH_2)_nOH$	Non-ionique
Poly (éthylène oxyde) « PEO »	$-(-CH_2CH_2O-)_n$	Non-ionique
Acide Polylactique « PLA »	$-(OCHCH_3CO)-_n$	Non-ionique
Poly (cyanoacrylate)	$(CH_2CNCOORC)_n-$	Non-ionique
Poly (vinyl alcool)	$(CH_2CH(OH)-)_n-$	Non-ionique
Poly (éthylène imine)	$H(NHCH_2CH_2)_nNH_2$	Cationique
Polypeptides	$-(NHCHRCO)_n-$	Ampholytes

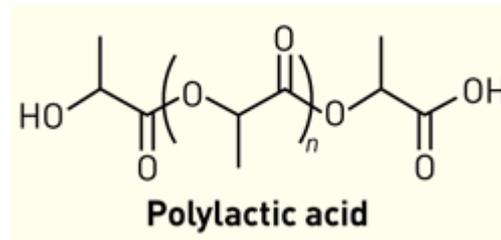
**Table 11 : Polymères synthétiques préformés utilisés pour la synthèse d'hydrogels.**  
Source<sup>170</sup>.

#### II.3.3.1. Hydrogels à base de PLA

L'acide polylactique ou PLA (Figure 23), appartient à la classe des poly- $\alpha$ -hydroxy esters qui sont les polyesters synthétiques les plus répandus. Les PLA sont déjà utilisés depuis plus de vingt ans dans le secteur biomédical pour produire du fil de suture, des broches ou des enrobages de médicaments.

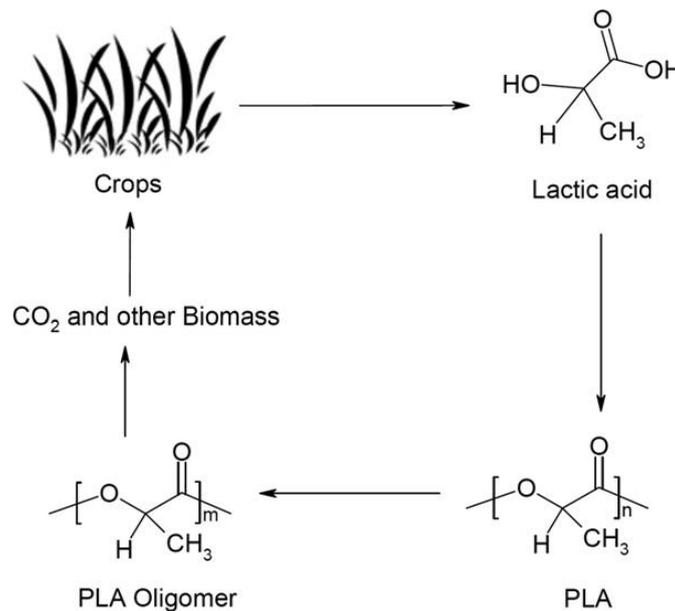
Ainsi, la dégradation de ces polymères est fonction de leur composition. Ils sont solubles dans les solvants aqueux, non-ioniques et ont une structure semi-cristalline. De façon

générale, les polymères cristallins se dégradent plus lentement étant donné l'accès limité des molécules d'eau aux liens esters clivables.



**Figure 23 : Squelette d'un polymère composé de PLA.**

Les PLA sont reconnus pour leur biocompatibilité et utilisés pour des applications biomédicales chez l'humain. En effet, ses produits de dégradation sont consommés par les cellules suite à la dégradation hydrolytique du PLA qui permet sa dégradation en acide lactique (Figure 24). Ce dernier est un métabolite de la glycolyse qui sera ensuite recyclé suite à son entrée dans le cycle de Krebs dont le rôle est de générer de l'ATP.



**Figure 24 : Cycle de vie du PLA.** Le PLA est un polymère totalement biodégradable et biocompatible. Source<sup>171</sup>.

Les PLA ont un autre avantage : ils sont approuvés par la FDA dans certaines applications humaines. De plus, le PLA possède des propriétés mécaniques très intéressantes qui sont modulables en fonction de son poids moléculaire. Il peut avoir une grande amplitude allant de mou, élastique à rigide voir extrêmement dur et peut être dégradé de manière lente en métabolites non-toxiques par les organismes biologiques. Cependant, son domaine d'application est limité à cause de la difficulté à contrôler son taux d'hydrolyse, sa faible hydrophylité et sa cristallinité.

Pour pallier à ces problèmes, des mélanges avec d'autres polymères tels que les polyéthylènes glycol (PEG) ont été étudiés.

### II.3.3.2. Hydrogels à base de PEG

Au cours des dernières décennies, le polyéthylène glycol (PEG) est un polymère qui a été particulièrement utilisé pour la libération contrôlée de drogues diverses et variées<sup>172</sup>.

Le PEG est un polyéther non-ionique semi-cristallin et thermoplastique. La chaîne de PEG est inerte d'un point de vue chimique alors que les groupements hydroxyles terminaux peuvent être exploités pour la synthèse de copolymères. Ce polymère présente une solubilité aqueuse illimitée indépendamment de sa masse moléculaire, qui serait liée à la grande compatibilité entre le PEG et les molécules d'eau favorisant la formation de ponts hydrogène entre l'eau et les atomes d'oxygène du PEG. Cette association entre l'eau et le PEG crée une couche d'hydratation dans laquelle les molécules d'eau adoptent une orientation spécifique autour des chaînes de polymère. Il est reconnu comme étant un polymère biocompatible avec un faible degré d'immunogénicité<sup>173</sup> mais est non biodégradable. Les PEG de masse moléculaire inférieure à 30-40 kDa sont toutefois éliminés de l'organisme par voie rénale<sup>174</sup>. Sa clairance dans l'organisme est élevée<sup>165</sup>.

Des dérivés amphiphiles du PEG, c'est-à-dire comportant des segments de nature hydrophobe ont aussi été développés afin d'améliorer son adsorption à la surface des particules. La famille des poloxamères et poloxamines regroupe les copolymères composés de segments de PEG et de polypropylène glycol (PPG), ayant des ratios hydrophile/hydrophobe variables selon la longueur des chaînes de PEG/PPG. Les segments PPG plus hydrophobes s'adsorbent à la surface des nanoparticules, laissant les segments de

PEG hydrophiles en extension dans le milieu aqueux<sup>175,176</sup>. D'autres dérivés amphiphiles ont par la suite été développés dans le but d'améliorer une fois de plus l'adsorption du PEG en surface des particules. Ces dérivés sont des copolymères diblocs présentant une structure générale PEG-R, où R est le plus souvent à base de polyesters hydrophobes comme le PDLLA, le PLGA ou le PLA<sup>177-179</sup>.

Le PEG est approuvé par la FDA pour usage alimentaire, cosmétique et les produits pharmaceutiques dont les formulations sont destinées à la voie IV, cutanée/topique, rectale et nasale<sup>180</sup>.

### **II.3.3.3. Hydrogel à base du copolymère PEG-PLA**

De plus en plus d'attention est apportée aux copolymères (ester-éther) amphiphiliques, et plus particulièrement aux blocs de copolymères à base de PEG et PLA, pour de nombreuses applications biomédicales et pharmaceutiques<sup>181</sup>. Le PEG et le PLA sont les polymères les plus utilisés des familles de polyéthers et des polyesters biodégradables en raison de leurs remarquables propriétés. Ces copolymères peuvent être dissous dans l'eau. De plus, la copolymérisation offre la possibilité de combiner l'hydrophilicité du PEG, la biodégradabilité du PLA afin d'avoir des applications médicales plus vastes, dans les domaines de la chirurgie, de l'ingénierie tissulaire et du relargage d'agents thérapeutiques<sup>181</sup>.

L'association PEG-PLA est particulièrement intéressante pour le relargage prolongé des molécules : le caractère amphiphilique du mélange de polymère avec la partie PLA permet de piéger les molécules hydrophobes et le PEG les hydrophiles<sup>182</sup>. D'autre part, le mélange de ces deux polymères permet de stabiliser le degré de souplesse ou de rigidité du polymère. Et enfin, l'ajout de PEG dans le copolymère permet la diminution de la phagocytose par les monocytes par rapport aux particules de PLA sans PEG. Les propriétés inhibitrices d'opsonisation du PEG permettent une plus longue circulation de la molécule active dans la circulation ou sur le site de libération<sup>183</sup>.

### II.3.3.4. Le MedinGel™

L'hydrogel que nous avons utilisé, le MedinGel™ est un copolymère formé de PEG et de PLA (Figure 25). Après son injection, il forme un dépôt semi-solide capable de garder intact les molécules piégées dans son réseau tridimensionnel et de les libérer de manière variable dans le temps (Figure 26). Il est intégralement biocompatible et biodégradable.

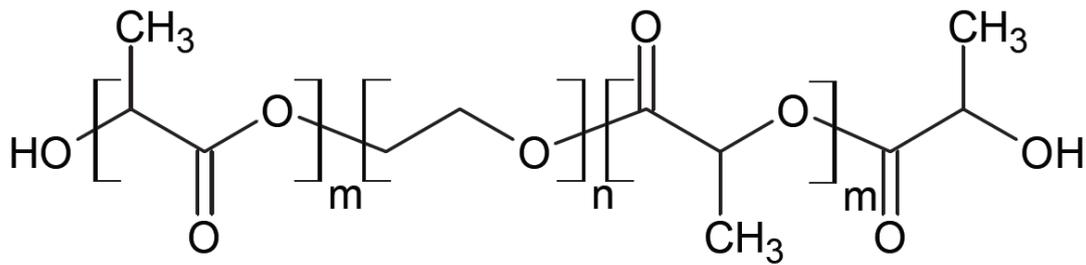


Figure 25 : Structure du copolymère PLA/PEG.

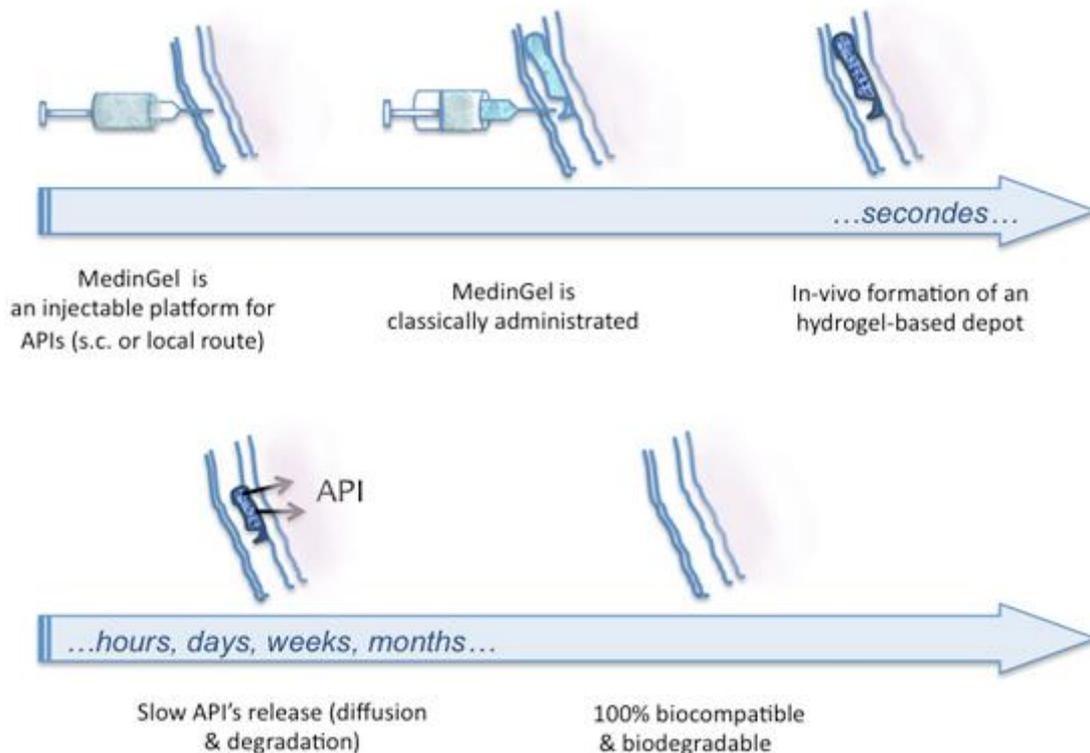


Figure 26 : Principe d'utilisation du MedinGel™. Source<sup>184</sup>.

Les chaînes hydrophiles (PEG) peuvent piéger des molécules hydrophiles, alors que les micro-domaines hydrophobes (PLA) permettent la solubilisation de substances hydrophobes. Il est possible de faire varier la taille du PEG ou du PLA de manière à optimiser la structure du polymère et à l'adapter au mieux au principe actif que l'on veut y introduire. Chaque polymère est caractérisé par la longueur du PEG (indiqué par le poids moléculaire de celui-ci) et par le rapport entre le PLA et le PEG. Ainsi, plus le PEG est grand, plus le maillage est lâche (libérant le principe actif plus rapidement), et plus le rapport PLA/PEG est important, plus l'hydrogel sera stable. Ainsi, plusieurs paramètres peuvent être modifiés pour adapter au mieux l'hydrogel à la molécule à administrer. Les différents polymères d'hydrogel sont appelés PxRy. Cette abréviation traduit pour P, la longueur (en kilo Daltons) des molécules de PEG utilisées et R le rapport PLA/PEG. On obtient des polymères appelés par exemple P2R2 pour une molécule ayant un PEG de 2 kDa et un rapport PLA/PEG de 2.

#### II.3.4. Biodégradabilité/Biocompatibilité

Avant de parler plus en détails de l'aspect biodégradable et biocompatible des polymères, il est important de bien différencier les terminologies qui vont être utilisées.

- **La dégradation** est un clivage chimique et/ou physique des chaînes macromoléculaires formant le système polymère, entraînant une altération des propriétés initiales.
- **La biodégradation** est une dégradation du système polymère en présence de cellules vivantes (Dégradation abiotique par des enzymes  $\neq$  biodégradation)
- **La biorésorption** est effective lorsque les résidus de dégradation d'un polymère biocompatible sont éliminés par l'organisme (bioassimilation, minéralisation ou filtration rénale)
- **La bioassimilation** est la conversion d'un composé en biomasse (matière organique constituant les organismes vivants et résidus organiques post-mortem).
- **La minéralisation** est la conversion d'un composé en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O et minéraux.

De ce fait, un polymère biodégradable est dégradable. De même, un polymère dégradable ou biodégradable n'est pas forcément bioassimilable, mais un polymère bioassimilable est *a fortiori* dégradable<sup>185</sup>.

### II.3.4.1. Biodégradabilité

La biodégradation correspond à l'ensemble des processus de dégradation dus à une activité biologique qui entraîne des modifications de la structure chimique du matériau menant à des composés métaboliques naturels. La biodégradation est parfaitement illustrée par le mécanisme de dégradation des polyesters aliphatiques à travers leur mécanisme d'hydrolyse<sup>186</sup>.

Un produit biodégradable doit :

- Ne pas créer de réaction toxique ou inflammatoire sur le site d'implantation ou dans le corps humain
- Avoir une demi-vie acceptable à l'échelle d'une thérapie humaine.
- Avoir un temps de dégradation du matériel qui doit être compatible avec le temps de cicatrisation ou de régénération.
- Avoir des produits de dégradation non toxiques, métabolisables et/ou éliminables par l'organisme
- Avoir une perméabilité et une faculté de traitement spécifique pour chaque application.

### II.3.4.2. Biocompatibilité

La biocompatibilité se définit par la capacité d'un biomatériau à remplir sa fonction sans engendrer d'effet indésirable chez son hôte. Elle peut se résumer en quatre termes : non toxique, non immunogène, non carcinogène et non thrombogénique<sup>187</sup>. Elle est essentielle afin d'éviter le rejet du matériau ou les problèmes de toxicité. La biocompatibilité est caractéristique de l'implant. En effet, la surface, la taille, la porosité, et la forme sont des facteurs de biocompatibilité. La plupart des propriétés des polymères (poids moléculaire, solubilité, forme et structure de l'implant, hydrophilicité/hydrophobicité, dégradation/mécanisme d'érosion) affectent leur biocompatibilité. La biocompatibilité est une notion très importante, car si un hydrogel n'est pas biocompatible, un début de réaction immunitaire sera générée au niveau du site de l'implant et une capsule fibreuse qui limitera la pénétration du médicament sera formée. Suite à l'initiation de cette réaction immunitaire, des réactions d'activation du complément accentueront l'inflammation et le rejet de l'hydrogel.

L'implantation ou l'injection d'un vecteur thérapeutique induit une réponse inflammatoire dont le degré varie avec la nature du biomatériau. Celle-ci implique des composantes vasculaire, humorale et cellulaire identiques à celles provoquées par une infection microbienne ou un traumatisme physique. L'introduction d'un implant est une lésion générant un traumatisme des tissus conjonctifs environnants. Enfin, s'il y a persistance du stimulus inflammatoire, une inflammation chronique peut se produire et sera caractérisée par la présence de macrophages, de monocytes et, plus particulièrement de lymphocytes. Lors de la phase finale de la guérison, si l'implant ne peut être phagocyté, il se formera des corps cellulaires géants ainsi qu'une capsule fibreuse autour de l'implant pour l'isoler des tissus environnants<sup>188</sup>.

### III. OBJECTIFS DE CETTE ETUDE

Comme nous l'avons vu dans cette Partie "Etat actuel du Problème", la forme galénique de certaines chimiothérapies, en particulier celle du Paclitaxel, pourrait être améliorée, notamment grâce aux systèmes de polymères biodégradables. Pour cela, un ou plusieurs actifs doivent être intégrés dans un polymère, cette formulation doit être testée sur un modèle animal.

C'est pourquoi les objectifs suivants ont été assignés pour ce travail de thèse :

1. Disposer d'un modèle animal fiable et reproductible, si possible sur un animal immunocompétent, développant une tumeur dont la croissance peut être mesurée facilement après son implantation de manière orthotopique. C'est pourquoi le cancer du sein a été choisi.
2. Formuler le Paclitaxel dans un polymère aussi peu toxique que possible, qui soit utilisable en clinique humaine et vétérinaire, avec, éventuellement, une autre molécule de chimiothérapie.
3. Tester les vitesses de libération du ou des actifs par des dosages effectués *in vitro* mais dans des conditions se rapprochant des conditions physiologiques (agitation et 37°C).
4. Tester une ou plusieurs formulations sur le modèle animal de tumeur mammaire pour vérifier l'efficacité de la chimiothérapie seule ou combinée et la comparer avec le mode d'administration systémique classique.
5. Tester ces formulations sur le modèle animal de tumeur mammaire pour vérifier que la libération prolongée est bien effective *in vivo*.
6. Effectuer des tests de toxicité cutanée pour évaluer les risques potentiels de cette formulation.
7. Etendre l'usage des hydrogels à d'autres molécules anticancéreuses.

Nous allons présenter dans la Partie "Expérimentale", les résultats que nous avons obtenus vis-à-vis des objectifs énoncés ci-dessus. Pour plus de clarté dans l'exposé, les résultats seront formulés sous forme de "Projets".

# PARTIE EXPERIMENTALE

---

# PROJET N°1 : MODELE ANIMAL

---

## **Problématique :**

Les modèles animaux de cancers constituent un outil essentiel pour l'évaluation du potentiel antitumoral d'une nouvelle thérapie. Ils permettent de mieux appréhender l'efficacité et la toxicité du traitement. C'est pourquoi des modèles de cancers du sein ont été développés au laboratoire. Ces derniers se devaient de répondre à nos exigences concernant le site d'implantation (tumeur greffée de manière orthotopique), et le statut immunitaire de l'animal (immunocompétent).

## **Méthodes utilisées :**

- Culture et entretien des lignées cellulaires MDA-MB-231 et Walker 256 (Fiches techniques n°1 et n°2)
- Comptage cellulaire (Fiche technique n°3)
- Greffe de cellules cancéreuses sur un animal receveur (Fiches techniques n°4 et n°5)
- Suivi des animaux (Fiche technique n°6)
- Euthanasie et autopsie (Fiche technique n°7)
- Réalisation de coupes histologiques (Fiche technique n°8)
- Marquage de coupes histologiques (Fiche technique n°9)

## **Résultats :**

Aucune tumeur n'a pu être obtenue avec le modèle animal issu de la xéno greffe de cellules MDA-MB-231. Il a donc été abandonné. En revanche, compte tenu du fort taux de réussite de la greffe syngénique de cellules Walker 256, ce modèle a été caractérisé et retenu pour les travaux suivants.

## 1. Problématique

De nombreux modèles animaux de cancers du sein ont été décrits dans la littérature. Certains peuvent être induits de manière exogène lorsque l'animal est soumis à des carcinogènes (modèles chimio-induits), ou par la greffe de cellules tumorales. D'autres peuvent être induits de manière endogène en modifiant le génome de l'animal soit en surexprimant des oncogènes, soit en délétant un anti-oncogène (animaux transgéniques). Les modèles d'animaux greffés ont particulièrement retenu notre attention car ce sont les modèles les plus simples à mettre en place, et les plus reproductibles. La majorité des modèles de greffe décrits sont des xénogreffes et nécessitent l'utilisation d'animaux immunodéficients particulièrement onéreux, fragiles et difficiles d'entretien. Pour cela, nous souhaitons plutôt utiliser des animaux immunocompétents. Du point de vue de l'espèce, nous avons choisi de travailler sur le rat, tout d'abord pour le côté pratique, en effet pour travailler avec des techniques d'imagerie telle que le PET-Scan, le rat étant plus gros que la souris, il permet l'obtention de données plus fiables<sup>189</sup>. De plus, plusieurs auteurs ont reporté que les tumeurs de rat étaient plus proches de la pathologie humaine comparée à la souris<sup>190-195</sup>. Nous avons alors décidé de développer un modèle de cancer du sein orthotopique chez le rat immunocompétent. Pour cela deux essais de greffe ont été réalisés, l'un avec les MDA-MB-231 et l'autre avec les Walker 256.

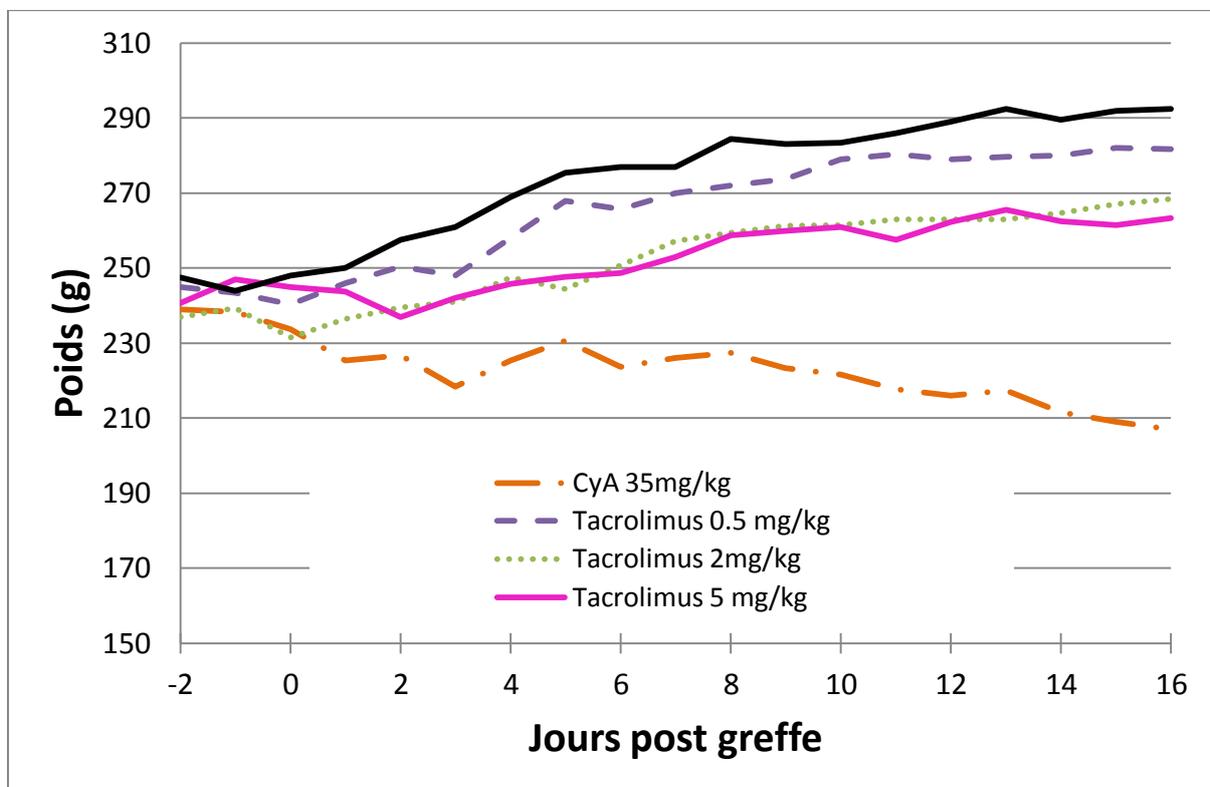
## 2. Modèle issu de la greffe de cellules MDA-MB-231

La base de ce modèle est une greffe de cellules humaines de cancer du sein, les MDA-MB-231, sur des rats traités à l'aide de l'immunosuppresseur cyclosporine A (CyA). Dans ce modèle, développé par B. Akla<sup>196</sup> sur des animaux immunocompétents, les tumeurs étaient bien vascularisées, infiltratives et métastasiantes. Ces caractéristiques semblables à celles de la pathologie humaine, nous ont mené à la remise en place du modèle.

### 2.1. Mise en œuvre du modèle MDA-MB-231

Conformément au protocole de Akla, des rates femelles Sprague Dawley âgées de 3 semaines (Elevage Depré, Saint Doulchar, France) ont été utilisées, à raison de 5 rates par groupe (CyA et témoin). L'injection des cellules MDA-MB-231 a été réalisée au niveau de la glande mammaire inguinale (Fiche Technique n°4). L'immunosuppression a été obtenue par

une injection quotidienne de CyA à 35 mg/kg par voie intrapéritonéale. Selon ce protocole, les tumeurs auraient dû être palpables 4 jours après la greffe (Fiche technique n°4), or, 15 jours après, nous n'avons rien détecté. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, une adaptation du protocole a été réalisée : l'immunosuppression des rats a commencé 2 jours avant la greffe et un second immunosuppresseur a été testé : le Tacrolimus (FK506). Le Tacrolimus a été choisi car son action immunosuppressive *in vitro* sur l'activation lymphocytaire est 100 fois supérieure à celle de la CyA. De plus, *in vivo* son effet immunosuppresseur est meilleur que celui de la CyA, il permet la réduction des rejets d'allogreffes<sup>197</sup>.



**Figure 27 : Impact des différents traitements immunosuppresseurs sur le poids des rates.** Les traitements immunosuppresseurs ont été administrés 2 jours avant la greffe.

Quel que soit l'immunosuppresseur choisi, aucune tumeur n'a été détectée après 15 jours. Cependant, il a été important de noter l'impact des immunosuppresseurs sur le poids des rates (Figure 27). La CyA est particulièrement toxique puisqu'elle a induit une perte de poids de l'ordre de 15% par rapport au poids de départ de l'animal sur 18 jours. Augmenter d'avantage la dose de CyA n'a donc pas été une option envisagée. Quand au Tacrolimus, du

fait de sa meilleure efficacité, il a été utilisé à des doses plus basses et a eu moins de répercussions sur le poids de l'animal.

La dernière tentative consistait à modifier, non pas l'immunosuppression de l'animal, mais le microenvironnement des cellules greffées. Enrichir le milieu de greffe par l'adjonction de facteurs de croissance aurait pu faciliter la prise de greffe. De la même manière, augmenter la concentration cellulaire en un point faciliterait les échanges paracrines. Pour cela, 10 millions de cellules préalablement mélangées à du Matrigel™ ont été injectées aux animaux. Le Matrigel™ a apporté un support matriciel aux cellules tumorales, ainsi que des facteurs de croissance. En effet, le Matrigel™ est une matrice extraite d'un sarcome de souris riche en protéines de matrice extracellulaire dont la laminine, le collagène IV, et des protéoglycanes, et contenant des facteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ , l'EGF, l'IGF et le FGF. Ce support de croissance est couramment utilisé en recherche pour faciliter la prise de greffe. Malgré cette dernière combinaison, associant immunosuppression (Tacrolimus) et utilisation de Matrigel™, aucune tumeur n'a été palpable 21 jours après la greffe.

## **2.2. Discussion des différentes tentatives de greffe du modèle MDA-MB-231**

Le modèle MDA-MB-231 constituait un modèle de greffe original puisqu'il alliait la xénogreffe à un animal receveur immunocompétent. Certes, l'immunité des animaux était diminuée par les traitements immunosuppresseurs, mais pas au point de nous contraindre à les héberger en zone stérile. En effet, les animaux traités aux immunosuppresseurs possèdent une immunité résiduelle supérieure à celle des lignées d'animaux immunodéficients (lignées de rats scid et nude). L'immunodépression n'est a priori pas la cause de l'échec de greffe, puisque les doses et les modes d'administrations utilisés correspondaient à ceux généralement utilisés dans la littérature pour permettre l'implantation de greffons chez la même souche de rat<sup>198</sup>. En revanche, nous pouvons penser que la lignée cellulaire peut être la cause du problème. Les cellules utilisées dans l'ancien protocole n'étaient pas viables, nous avons dû acheter une nouvelle lignée de MDA-MB-231 (Cell Line Service, Allemagne). Ces cellules bien qu'issues de la même lignée d'origine, ont pu subir des dérives<sup>199-201</sup>. Wenger et al<sup>201</sup> ont démontré sur des cellules de la lignée MCF-7 que

le caryotype variait en fonction du temps de culture et du nombre de passages. Ces modifications géniques peuvent conférer aux cellules un avantage sélectif.

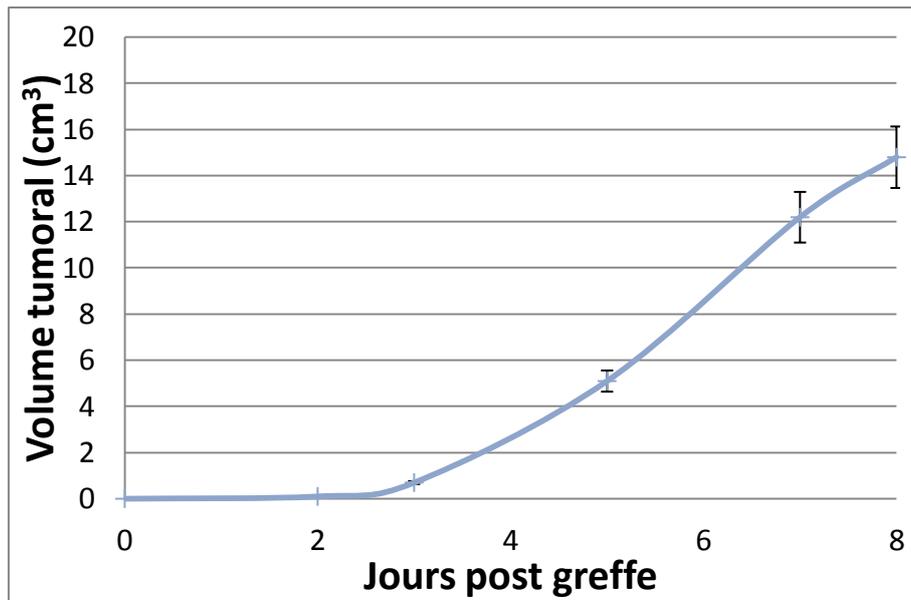
Les essais de mise en place de ce modèle nous ont permis de mieux appréhender l'immunosuppression des animaux. En effet, l'immunosuppression est un traitement lourd et contraignant à la fois pour l'animal (injection intrapéritonéale et effets secondaires liés à la CyA et Tacrolimus) et pour le manipulateur (injection quotidienne). Aux vues du manque de résultats obtenus, nous avons alors décidé de développer un modèle de greffe orthotopique qui ne nécessitait pas d'immunosuppression : un modèle de greffe syngénique comme le modèle Walker 256.

### **3. Modèle issu de la greffe de cellules Walker 256**

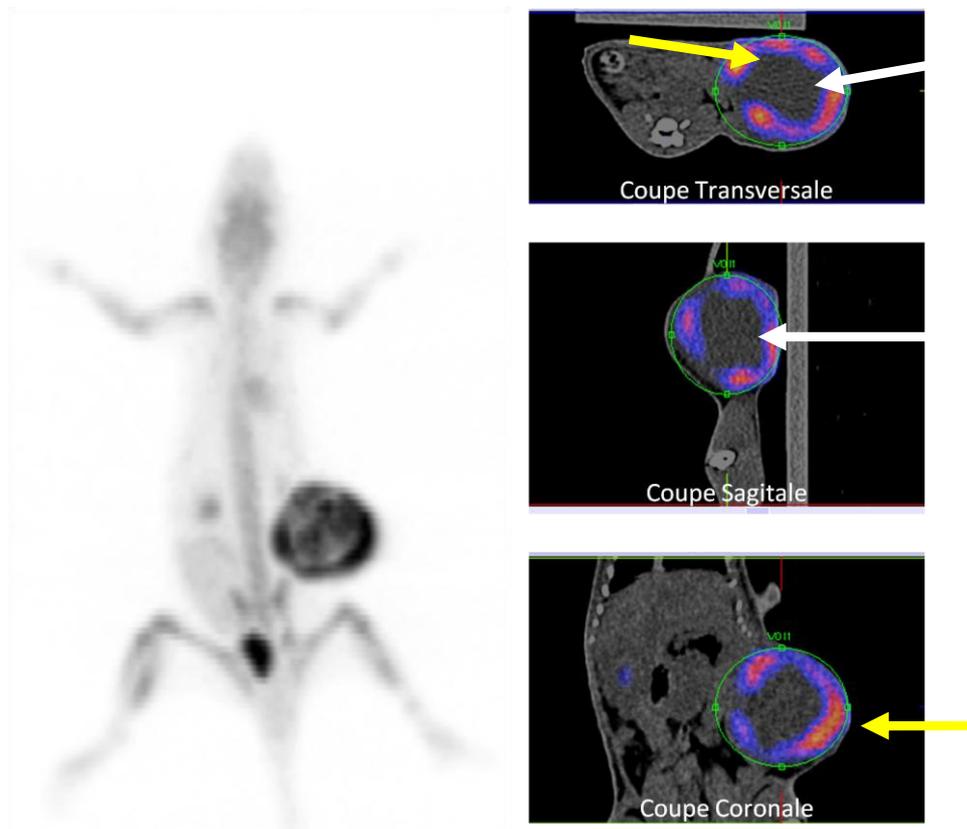
Une greffe syngénique nécessite l'utilisation de cellules de la même espèce que le receveur. Nous avons choisi la lignée Walker 256, issue d'un carcinome mammaire de rat et caractérisée par George Walker en 1961<sup>202</sup>.

#### **3.1. Mise au point de la greffe**

Les tumeurs induites par l'injection de  $10^7$  cellules de la lignée Walker 256 (Figure 28 ; Fiche Technique n° 5) ont été détectées dès le deuxième jour et le taux de prise de greffe a atteint 100%. Lors de leur détection, les tumeurs se sont présentées comme des néoformations mobiles à la palpation avec un diamètre inférieur à 0,5 cm. Cependant, les tumeurs se sont développées trop rapidement, 8 jours après la greffe de la tumeur les animaux ont dû être euthanasiés pour raisons éthiques (taille de tumeur >3,5cm).



**Figure 28 : Croissance tumorale après l'injection de  $10^7$  cellules de la lignée Walker 256.** Les cellules ont été injectées dans la glande mammaire inguinale gauche, sans matrice, sur 8 rates femelles Sprague Dawley âgées de 8 semaines. Les tumeurs sont palpables dès le deuxième jour après la greffe.



**Figure 29 : Exploration d'une rate au PET-SCAN.** La greffe a été réalisée avec  $10^7$  cellules Walker 256. Les images ont été réalisées 5 jours après la greffe et 3 heures après injection du  $^{18}\text{F}$ FDG (Fluoro Deoxy Glucose).

L'estimation du volume tumoral a été réalisée à l'aide de la formule de Carlsson<sup>203</sup> (Fiche technique n°6). Cette méthode permet d'évaluer le volume tumoral, néanmoins elle reste approximative. Le PET-Scan (Fiche technique n°17) permet non seulement d'avoir des informations quantitatives sur la tumeur (taille, profondeur), mais aussi sur son métabolisme et son potentiel métastatique. La tumeur Walker 256 de la Figure 29 mesure 3,4 x 2,8 x 3,1 cm et son volume est de 15,92 cm<sup>3</sup>. La tumeur est bien délimitée et ne semble pas générer de métastases (limite de détection : 2 mm). La partie métaboliquement active de la tumeur est la partie la plus périphérique (Figure 29, Flèches jaunes), en revanche le centre consomme peu de glucose et peut être considéré comme nécrotique (Figure 29, Flèches blanches).

### 3.2. Influence du nombre de cellules sur le développement tumoral

Afin de réduire la vitesse de croissance tumorale et compte tenu du pourcentage de prise de greffe élevé (100%) (Cf. Figure 28), l'influence du nombre de cellules sur la prise de greffe et la croissance tumorale a été évaluée.

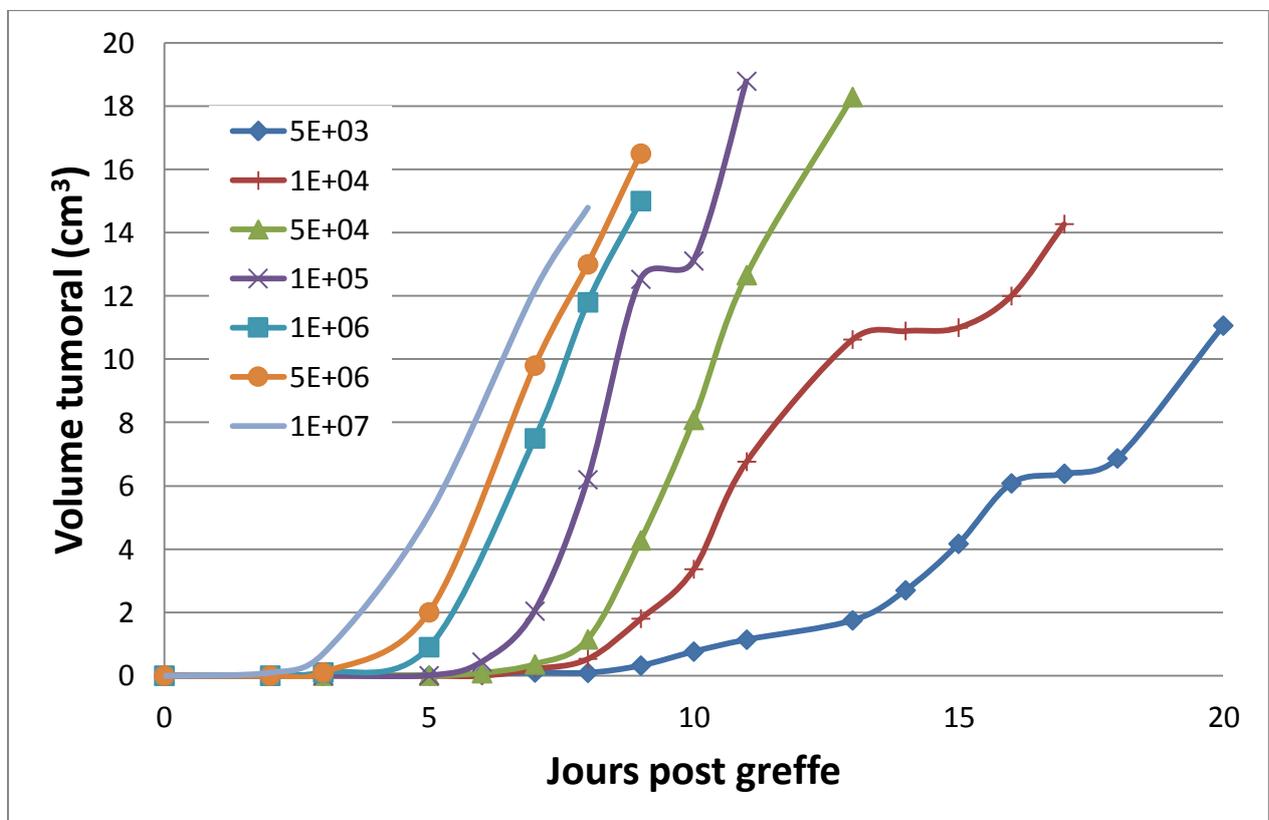
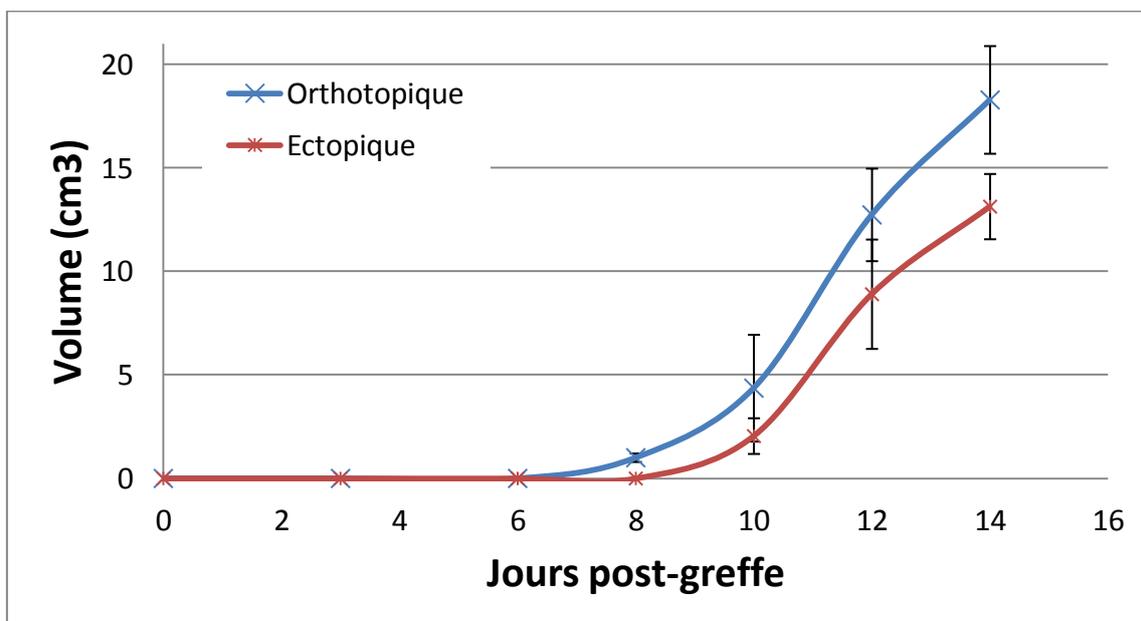


Figure 30 : Influence du nombre de cellules Walker 256 injectées sur la croissance tumorale.

Pour les animaux injectés avec  $5.10^5$ - $1.10^5$ - $1.10^6$ - $5.10^6$  cellules, les tumeurs ont été détectées entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour post-greffe, alors que 8 à 10 jours de latence ont été nécessaires pour détecter les tumeurs suite à l'injection de  $5.10^3$  cellules. La prise de greffe a été de 100% pour les animaux injectés avec  $5.10^5$ - $1.10^5$ - $1.10^6$ - $5.10^6$  cellules, alors que seulement 40% des animaux ont développé des tumeurs suite à l'injection de  $5.10^3$  cellules. En diminuant le nombre de cellules injectées, le temps de latence a pu être augmenté mais les chances de prise de greffe ont été réduites. La greffe de  $10^4$  cellules semble être un bon compromis puisque suite à 7 jours de latence, la prise de greffe a été de 100%. Pour les cohortes d'animaux suivantes, le choix de  $10^4$  cellules a été retenu.

### 3.3. Influence du site d'injection sur le développement tumoral

Le microenvironnement joue un rôle prépondérant au cours de la carcinogénèse<sup>43,127,204,205</sup>. Afin de mieux appréhender son influence sur le développement de notre modèle, nous avons greffé les cellules de manière orthotopique et ectopique. Pour la greffe de cellules de manière orthotopique, les cellules ont été injectées dans la glande mammaire inguinale à travers la mamelle. Pour la greffe ectopique les cellules ont été injectées sur le flanc gauche de l'animal.

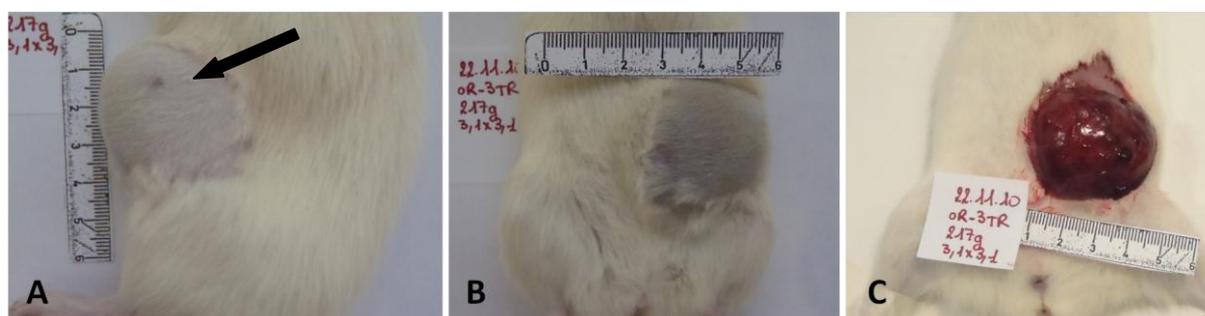


**Figure 31 : Influence du site d'injection sur la prise de greffe.** Des rates femelles Sprague Dawley de 8 semaines, ont été greffées avec  $10^4$  cellules Walker 256 au niveau de la glande mammaire (orthotopique, 8 rates) ou dans le flanc au niveau sous cutané (ectopique, 8 rates).

Le temps de latence a été le premier point de divergence entre les deux sites d'implantation. Les tumeurs greffées de manière orthotopique ont été détectables dès le 7<sup>ème</sup> jour post greffe alors que celles greffées de manière ectopiques le sont au 9<sup>ème</sup> (Figure 31). La vitesse de croissance tumorale est comparable entre les deux groupes : les temps de doublement des tumeurs orthotopiques et ectopiques sont de 1,96 et 2,11 jours respectivement. Le taux de prise de greffe est un second point de divergence: 100% des rates greffées de manière orthotopique développent des tumeurs (8/8), contre 75% pour les rates greffées en ectopique (6/8).

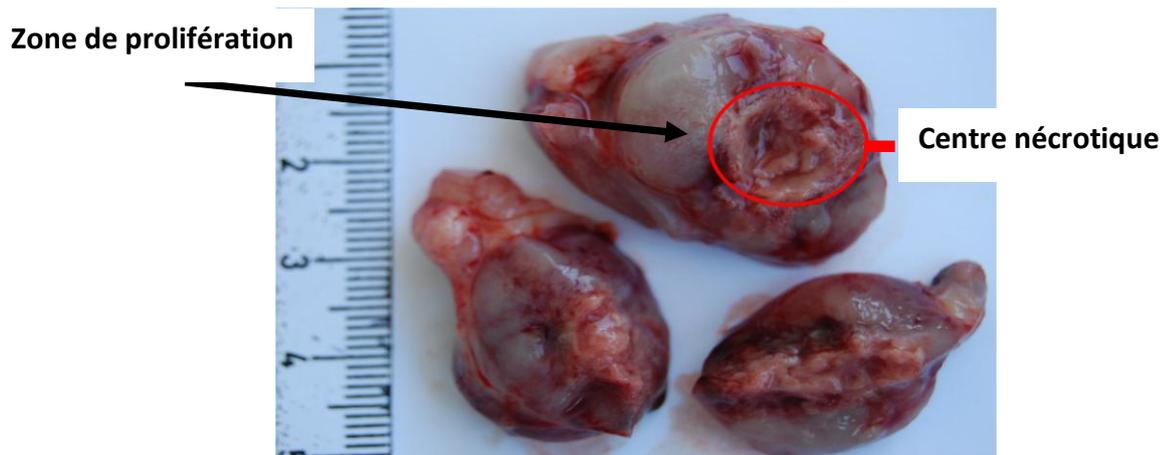
### 3.4. Caractéristiques macroscopiques des tumeurs

Quel que soit le site d'implantation, les tumeurs n'ont pas ulcéré la peau des animaux. Lors de l'autopsie des animaux, les tumeurs sont apparues comme bien définies (Figure 32), la peau s'est facilement dissociée de la tumeur. Les tumeurs sont aussi très vascularisées (Figure 32-C), après avoir enlevé la première couche de peau, il a été possible de visualiser l'aspect sanguinolent de la tumeur.



**Figure 32 : Aspect macroscopique externe d'une tumeur Walker 256.** (A) Vue sagittale, (B) de face, et (C) après dissection d'une tumeur greffée de manière orthotopique. La zone d'injection autour de la glande inguinale (flèche) a été épilée.

Les tumeurs une fois excisées ont été coupées et photographiées (Figure 33). Il a été constaté que le cœur de la tumeur était nécrotique de part son aspect spongieux (Figure 33). Seule la partie périphérique de la tumeur était active.



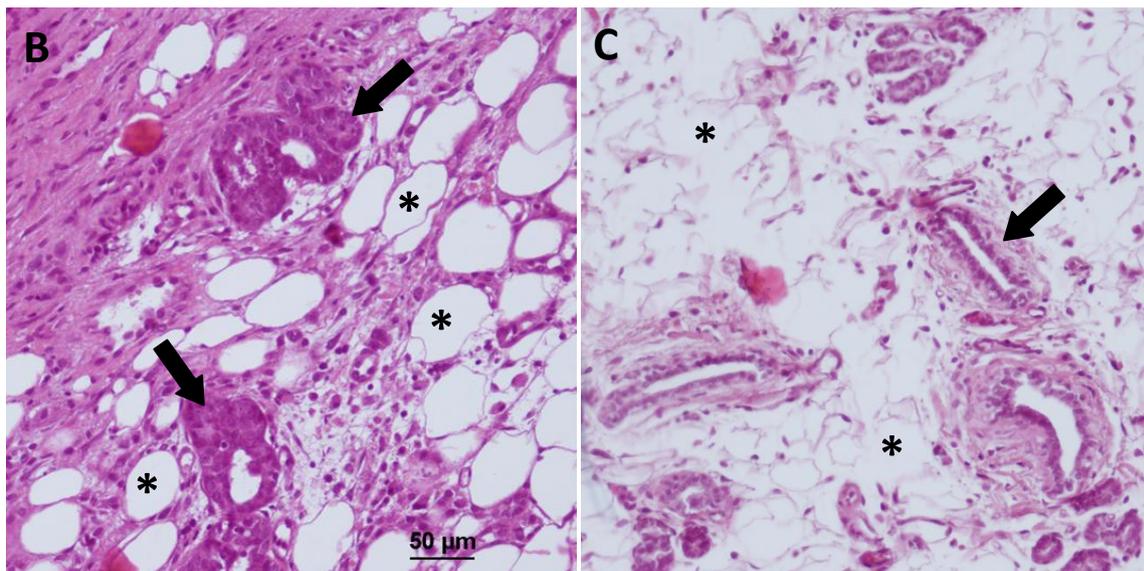
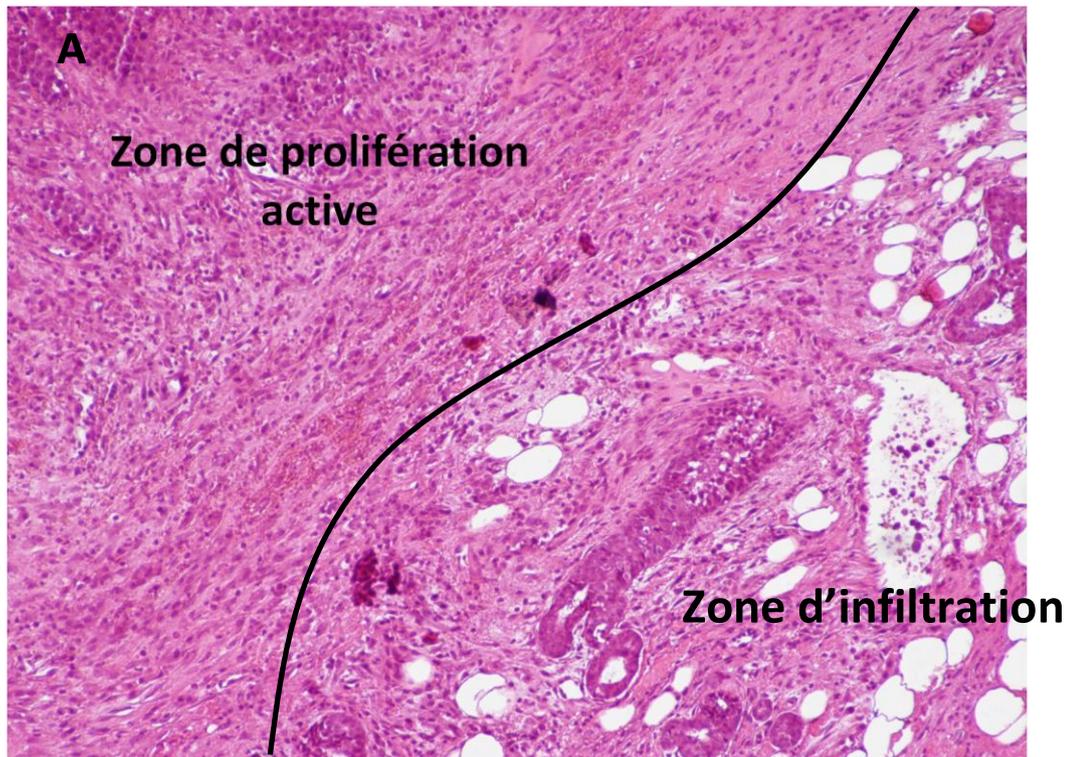
**Figure 33 : Coupe de tumeur, après excision.** On constate que le centre de la tumeur est nécrosé (cercle rouge), seule la partie périphérique semble viable et active (flèche).

### 3.5. Caractéristiques anatomopathologiques des tumeurs issues de la greffe de cellules Walker 256 de manière orthotopique ou ectopique

On distingue sur les coupes (Fiche Technique n°8), préparées à partir des tumeurs des deux groupes, ectopique et orthotopique (Figures 34 et 35) des zones où la prolifération tumorale est importante, caractérisées par la présence de nombreuses mitoses et vaisseaux (Cf. Partie 3.5.3 "Vascularisation tumorale") ainsi que des plages importantes de nécrose (Cf. Partie 3.5.2 "Nécrose"). La tumeur est infiltrante (Cf. Partie 3.5.1 "Caractère infiltrant des tumeurs") puisque l'on retrouve dans la masse tumorale des structures de type canaux galactophores, du tissu adipeux et des faisceaux musculaires. La tumeur, d'architecture massive, présentait des cellules de grande taille dont le cytoplasme était éosinophile, les noyaux irréguliers, et les mitoses nombreuses. Le stroma était dit de type endocrinoïde caractérisé par la présence de nombreux vaisseaux à paroi fine.

#### 3.5.1. Caractère infiltratif des tumeurs

Quel que soit le lieu d'injection des tumeurs, celles-ci ont infiltré les tissus périphériques. Les tumeurs orthotopiques ont infiltré les différentes structures de la glande mammaire telles que les canaux galactophores, le tissu adipeux et les muscles (Figure 34).



**Figure 34 : Tumeur orthotopique infiltrant la glande mammaire.** (A) Tissu tumoral (x100), (B) Tissu tumoral (x 400) : on distingue les cellules tumorales qui envahissent les canaux galactophores (Flèches) et le tissu adipeux mammaire (astérisques). (C) Tissu normal : les flèches représentent les canaux excréteurs sans invasion tumorale et les astérisques le tissu adipeux mammaire.

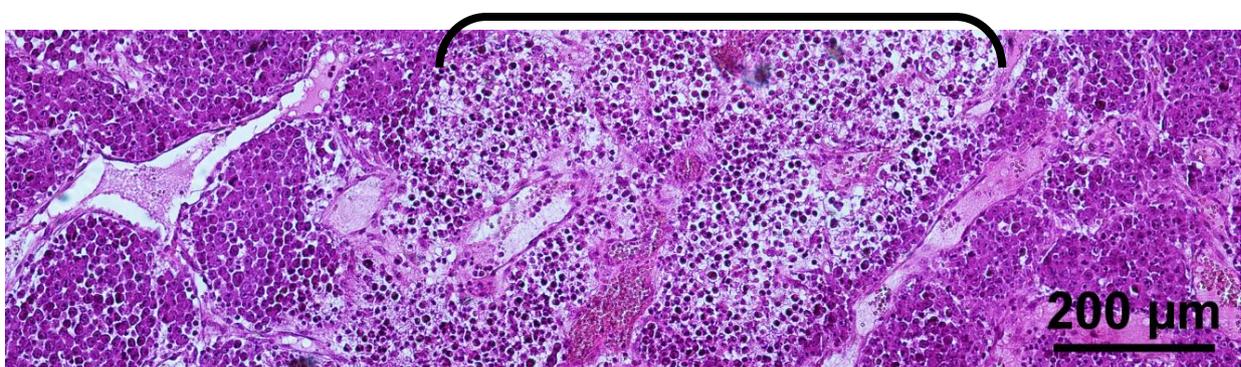
Les tumeurs ectopiques ont infiltré les tissus périphériques. Les tumeurs ectopiques ayant été implantées dans le flanc de la rate, ont progressé à travers la couche musculaire dissociant ainsi les faisceaux de muscles (Figure 35).



**Figure 35 : Infiltration d'une tumeur ectopique.** Le tissu musculaire est infiltré par la tumeur, on observe des fibres musculaires écartées par le tissu tumoral (Flèches). Un faisceau nerveux (astérisque\*) est aussi retrouvé.

### 3.5.2. Nécrose

Les zones de nécroses sont visibles d'un point de vue macroscopique, mais l'anatomopathologie permet de quantifier de manière plus précise la proportion qu'elles représentent. La nécrose cellulaire associe des altérations nucléaires et cytoplasmiques. Les cellules en souffrance perdent le contact les unes avec les autres. Les noyaux, devenus picnotiques, se sont rétractés et sont devenus plus sensibles à la coloration hématoxyline-éosine. Quel que soit le mode de greffe (orthotopique ou ectopique), la surface de la zone de nécrose moyenne est de 70%.

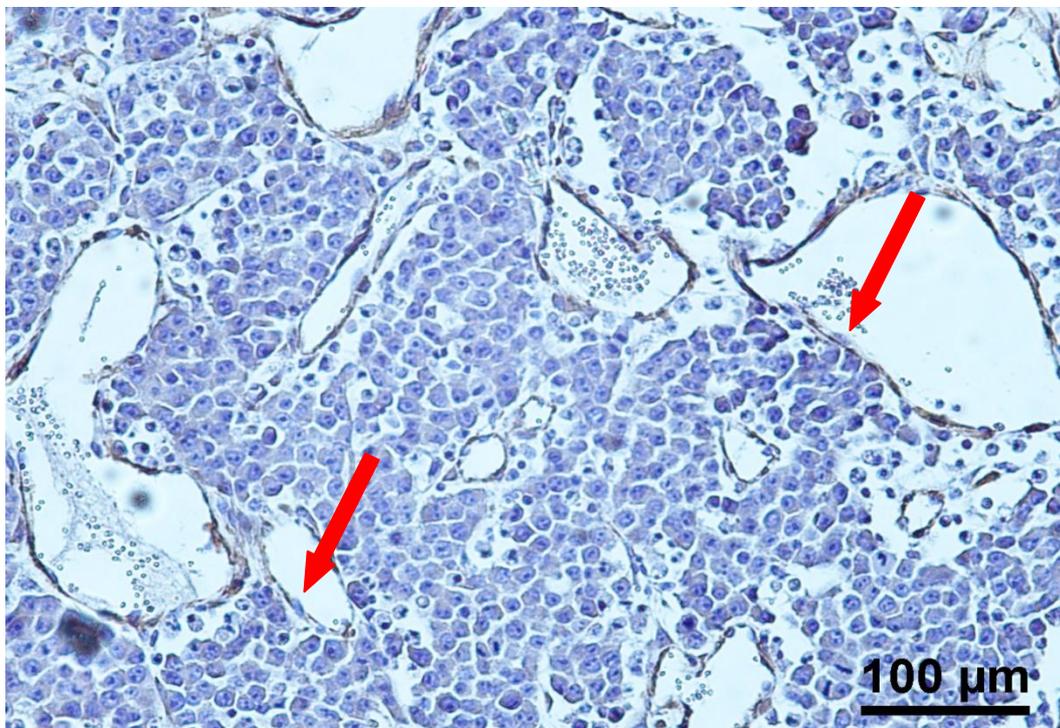


**Figure 36 : Plage de nécrose centrale.** Issue d'une tumeur greffée de manière orthotopique. La zone de nécrose est signalée par le crochet (⌈ ).

### 3.5.3. Vascularisation tumorale

#### 3.5.3.1. Structure vasculaire

Nous avons étudié la structure des vaisseaux sanguins. Pour cela, les vaisseaux ont été marqués par un anticorps anti- $\alpha$  actine dirigé contre les cellules musculaires vasculaires. Ce marquage a permis de révéler une vascularisation dense et anarchique. Pour les tumeurs des deux groupes (orthotopique et ectopique), la paroi vasculaire est fine, et est composée d'une seule couche de cellules endothéliales, et bordée par une couche de cellules musculaires vasculaires (Figure 37).

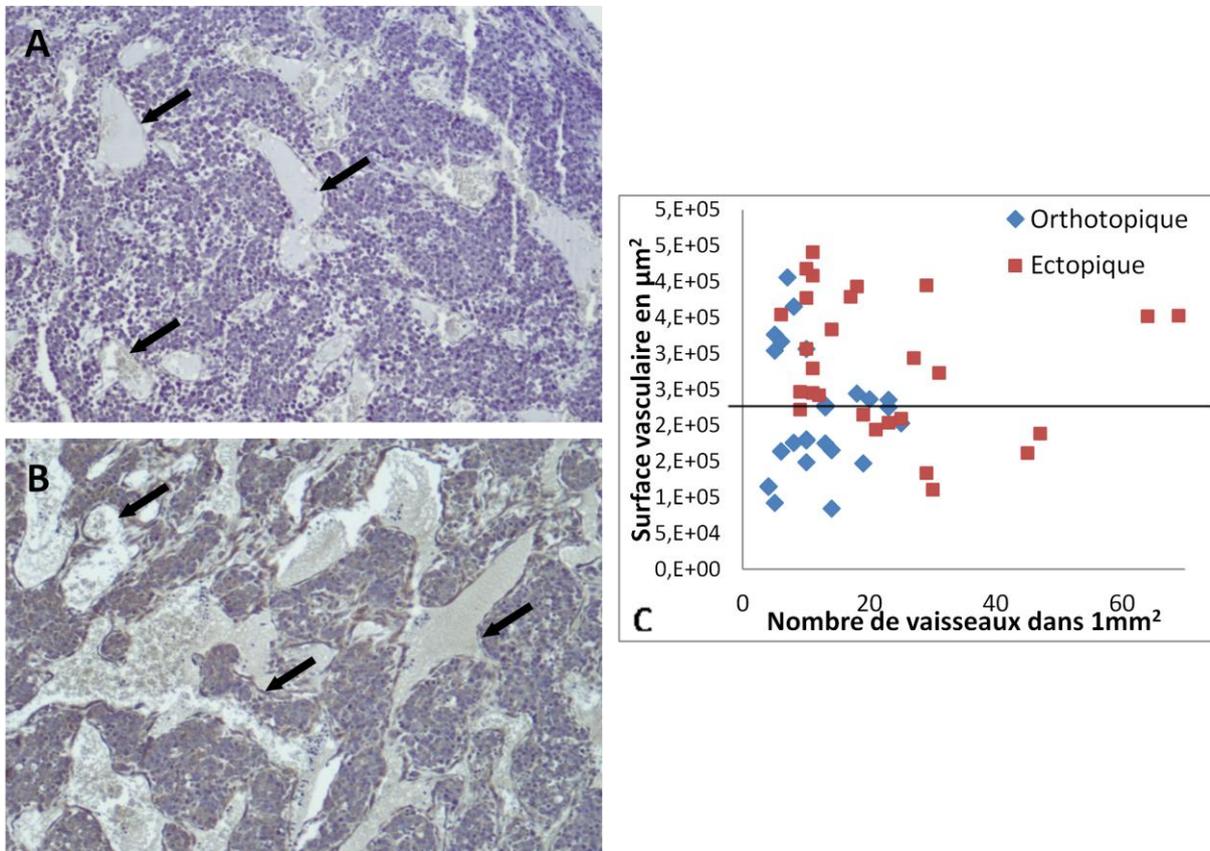


**Figure 37 : Vascularisation d'une tumeur orthotopique.** Les cellules musculaires vasculaires sont marquées à l'aide d'un anticorps anti- $\alpha$  actine. Les flèches rouges indiquent les cellules endothéliales.

N'ayant pas pu observer de différences structurelles au niveau des vaisseaux sanguins entre les tumeurs orthotopiques et ectopiques, la densité vasculaire intra-tumorale a donc été étudiée.

### 3.5.3.2. Densité vasculaire

La vascularisation diffère entre les deux sites d'implantation. Les tumeurs greffées de manière ectopique développent un réseau vasculaire plus important que les cellules greffées de manière orthotopique, on retrouve plus de vaisseaux et de plus grande taille (Figure 38). Le nombre moyen de vaisseaux pour les tumeurs ectopiques est de  $22 \pm 6$  par  $\text{mm}^2$  de tumeur, versus  $11 \pm 4$  pour les tumeurs orthotopiques. La surface vasculaire, représentée par l'aire des vaisseaux intra-tumoraux dans  $1 \text{ mm}^2$  de coupe est aussi plus importante pour les tumeurs ectopiques ( $280\,000 \pm 60\,000 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$  de tumeur) que pour les tumeurs orthotopiques ( $210\,000 \pm 65\,000 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$  de tumeur).



**Figure 38 : Vascularisation intra-tumorale.** (A) Coupe de tumeur orthotopique, les flèches représentent les vaisseaux. (B) Coupe de tumeur ectopique, les flèches représentent les vaisseaux. Les cellules endothéliales sont marquées par un anticorps anti-CD31 (x100). (C) Comparaison de la densité et de la surface vasculaire des tumeurs ectopiques et orthotopiques *in vitro*.

### 3.6. Discussion du modèle issu de la greffe de cellules Walker 256

Le modèle Walker 256 offre plusieurs avantages pratiques. Le taux de prise de greffe est de 100% et la mise en œuvre est simple puisqu'une injection à travers la mamelle de la rate suffit. En termes de reproductibilité, l'intégralité des tumeurs d'une même série de greffes est détectable en 12 heures d'intervalle, et la vitesse de croissance tumorale est comparable entre les animaux avec des volumes tumoraux en point final (14 jours post-greffe) allant de 16 à 19 cm<sup>3</sup>. La composition anatomopathologique de la tumeur est homogène, les tumeurs sont infiltrantes, vascularisées et nécrosées.

Le caractère orthotopique de la greffe est un paramètre important. La glande mammaire produit un grand nombre d'hormones (principalement œstrogènes<sup>206</sup> et prolactine<sup>207</sup>) et de cytokines (FGF et TGF- $\beta$ <sup>204</sup>) qui vont stimuler la carcinogenèse de l'épithélium normal et la progression des cellules tumorales. Ces facteurs agissent non seulement sur la multiplication des cellules tumorales mais peuvent aussi jouer un rôle anti-apoptotique et pro-métastatique. La concentration locale en facteurs de croissance étant plus importante qu'en sous-cutané<sup>206</sup>, elle est en partie responsable de la différence de croissance constatée entre les tumeurs greffées en orthotopique et ectopique.

L'aspect syngénique de la greffe est un atout, même si un grand nombre de modèles animaux actuels sont des xéno greffes. La composition du stroma mammaire est différente entre les rongeurs et les humains. Alors que le stroma mammaire des rates et souris est composé en très grande partie par du tissu adipeux, le stroma mammaire humain contient aussi un fort taux de fibroblastes environnant le compartiment épithélial<sup>208</sup>. Les cytokines et hormones sécrétées par les fibroblastes - qui ont un rôle clé dans la prolifération des cellules tumorales et la vascularisation - ont des spécificités qui expliqueraient que les tumeurs humaines aient du mal à se développer chez les rongeurs, même immunodéprimés. De plus, les animaux utilisés ici sont immunocompétents. En dehors du côté pratique (élevage en zone conventionnelle, animaux résistants, moins onéreux), les animaux immunocompétents permettent une meilleure évaluation des molécules anticancéreuses testées car les chimiothérapies peuvent influencer la réponse immunitaire dirigée contre la tumeur. L'administration de taxanes (PTX par exemple) à des patientes atteintes d'un cancer du sein localisé, est associée à des taux plus élevés de lymphocytes T et cellules NK activés par rapport aux patientes non traitées<sup>171</sup>. Sur le long terme, cette activation permet un meilleur contrôle de la tumeur par le système immunitaire et des chances de survie plus élevées<sup>172</sup>.

Cependant, le modèle Walker 256 présente aussi un certain nombre de désavantages. En effet, une rate ne recevant pas de traitement devra être euthanasiée dans les 7 jours suivant la greffe pour des raisons éthiques telles que la taille de la tumeur (si le diamètre est supérieur à 3,5 cm) ou encore la perte de poids trop importante de l'animal (si > 20%). La plupart des modèles de greffes syngéniques se développent sur plusieurs semaines<sup>209-211</sup>. Dans le cas de notre modèle, la croissance tumorale étant très rapide, elle ne permet pas de traiter les animaux très longtemps et la dégradation générale de l'animal peut biaiser la réponse thérapeutique. En conséquence, le traitement doit être administré dès la détection de la tumeur, et les doses utilisées doivent être élevées si on veut observer l'effet de la molécule. De plus, cette croissance tumorale rapide ne permet pas aux métastases de se développer, alors que le traitement des métastases est un problème de fond dans le cadre de la thérapie humaine. Ce modèle n'est pas non plus adapté pour l'étude mécanistique, il est très difficile d'étudier d'une part l'évolution phénotypique de la tumeur, et d'autre part les mécanismes de transformations tumorales tels que l'évolution du microenvironnement tumoral, de la vascularisation, de l'innervation. Malgré ses imperfections, ce modèle nous permettra d'évaluer l'efficacité ou non du relargage local de chimiothérapie.

## PROJET N°2 : CHOIX DES MOLECULES ANTICANCEREUSES

---

### **Problématique :**

Notre molécule principale, le PTX, a été choisie non seulement pour son efficacité antitumorale, mais aussi pour que sa libération via hydrogel constitue une amélioration galénique compensant sa faible biodisponibilité. Une nouvelle formulation galénique locale comme les hydrogels, permettrait de réduire la toxicité induite par son excipient principal lors de son injection I.V., le Crémophor. De plus, la formulation par hydrogel permet d'envisager la distribution de plusieurs molécules actives simultanément afin d'accroître l'efficacité thérapeutique par additivité d'effet ou synergie. Nous avons donc sélectionné plusieurs molécules candidates parmi lesquelles on retrouve des molécules cytotoxiques telles que l'Acide Ursolique et la Roscovitine, ainsi que des molécules anti-angiogéniques telles que le Sunitinib malate et le Fingolimod. L'association d'une de ces molécules au PTX est-elle plus intéressante que l'usage du PTX seul ?

### **Méthodes :**

- Culture et entretien de la lignée cellulaire Walker 256 (Fiche technique n°2)
- Comptage cellulaire (Fiche technique n°3)
- Réalisation du test de prolifération (Fiche Technique n°10)
- Test de migration cellulaire (Fiche Technique n°11)

### **Résultats :**

Les associations entre le PTX et l'Acide Ursolique ou la Roscovitine ne présentent pas d'avantage sur le PTX seul, contrairement aux associations PTX et Sunitinib ou PTX et Fingolimod dont les résultats permettent d'envisager un potentiel thérapeutique *in vivo*.

## 1. Problématique

La combinaison de chimiothérapies est une pratique courante pour augmenter l'effet cytotoxique des médicaments<sup>212-217</sup>. L'additivité d'effet ou la synergie de deux molécules est recherchée. De nombreuses études cliniques démontrent la supériorité des combinaisons de traitements par rapport au traitement seul que ce soit avec des molécules de chimiothérapie dites classiques ou des molécules dites ciblées.

- L'association du PTX avec la Gemcitabine démontre une efficacité supérieure à celle du PTX seul chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique. Le temps moyen de survie est augmenté (18.6 mois vs. 15.8) ainsi que le taux de réponse au traitement (41.4% vs. 26.2%)<sup>212</sup>.
- L'association du PTX avec l'Herceptin®, chez un groupe de patientes ayant un cancer du sein métastatique et surexprimant le récepteur HER2, augmente le taux de réponse au traitement par rapport au PTX seul (41% vs. 17%), le temps médian de réponse (10,5 vs. 4.5 mois), et le temps médian avant évolution de la maladie (7 vs. 3 mois)<sup>214</sup>.
- L'association du PTX avec des anti-angiogéniques (Bevacizumab) pour le traitement du cancer du sein, améliore aussi la réponse thérapeutique : la survie sans progression est améliorée par rapport aux patientes traitées par PTX seul (11,8 mois vs 5,9 mois), ainsi que le taux de réponse (36,9% vs 21,2%)<sup>90</sup>.

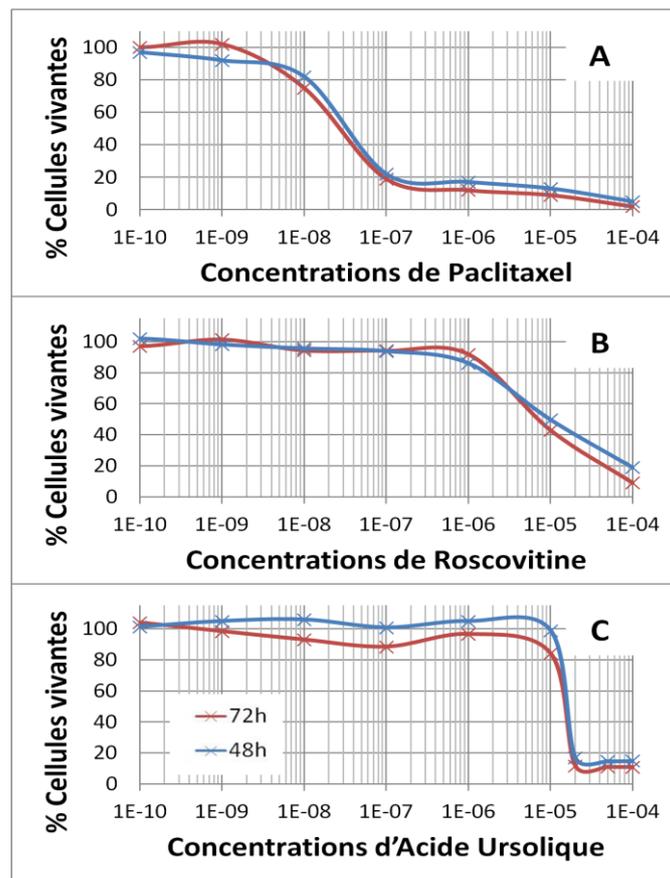
Les combinaisons améliorent l'efficacité thérapeutique. Cela se traduit par une augmentation du taux de réponse au traitement, un allongement du temps de survie sans rechute et du temps de survie. Dans ce but, nous avons tout d'abord déterminé les valeurs d'EC50 des différentes molécules afin d'estimer les concentrations actives, puis nous avons testé différentes combinaisons à l'aide de test de prolifération cellulaire *in vitro*.

## 2. Détermination des EC50 des différentes molécules

Les concentrations efficaces 50 (EC50) correspondent aux concentrations de drogues qui permettent un effet équivalent à 50% de la réponse maximale attendue. Dans le cadre d'agent cytotoxique, cette concentration est obtenue lorsque 50% de la population cellulaire est détruite. Des tests de prolifération cellulaire ont été réalisés (Fiche Technique n°10). Pour

cela, les cellules ont été soumises à des concentrations croissantes d'agents cytotoxiques et leur viabilité a été déterminée par comptage 48 et 72 heures après le début du traitement.

## 2.1. EC50 des molécules cytotoxiques (Paclitaxel, Roscovitine et Acide Ursolique)



**Figure 39: Détermination des concentrations efficaces 50 (EC50) des molécules cytotoxiques sur la lignée Walker 256 à 48 h et 72 h.** Après avoir été traitées avec des concentrations croissantes d'actifs le nombre de cellules viables a été compté avec un Scepter Cell Counter (Millipore). Les comptages ont été réalisés en triplicats pour chaque condition.

Le PTX, dont nous avons décrit le mode d'action dans la partie I.2.1.2.1. "Mécanisme d'action du Paclitaxel", a présenté une EC50 sur la lignée Walker 256 de  $8.10^{-7}$  mol/L (Figure 39-A).

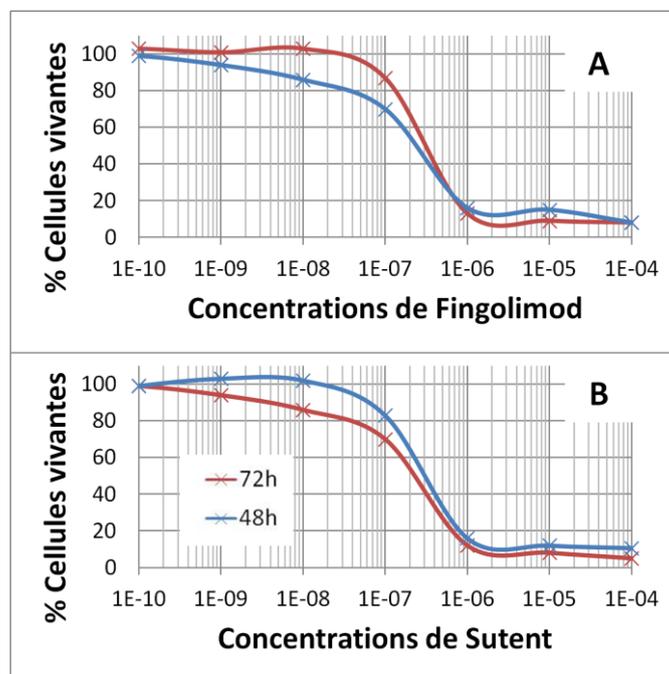
La Roscovitine (Seliciclib) est une molécule découverte et caractérisée par l'équipe C.N.R.S UMR 3151 'Protein Phosphorylation & Human Disease'. Elle appartient à la classe des inhibiteurs de kinase cycline-dépendante (Cdk). Elle inactive les Cdk2-7 et 9<sup>218</sup>. Il a été démontré qu'elle inhibait la prolifération et la progression du cycle cellulaire<sup>219,220</sup>. Elle permet de bloquer des cellules de cancer du sein (MCF-7 et MDA-MB-231) en phase G2/M<sup>220</sup> et induit l'apoptose via une voie p53 dépendante. *In vivo*, elle est capable de potentialiser l'action de la Doxorubicine et possède une action synergique avec la radiothérapie sur un modèle de xénogreffe de cancer du sein<sup>221</sup>. Elle est actuellement en phase d'étude clinique pour le traitement du cancer du sein métastatique. L'EC50 de la Roscovitine a été mesurée à  $3.10^{-5}$  mol/L (Figure 39-B).

L'Acide Ursolique (UA) est une molécule naturelle utilisée depuis de nombreuses années par notre équipe<sup>222-224</sup>. Dans le cadre du cancer du sein, son efficacité anti-proliférative a été testée *in vitro* sur les lignées MDA-MB-231 et MCF-7<sup>225</sup>, l'UA induit l'apoptose à la fois via la voie extrinsèque et intrinsèque<sup>226</sup>. Son effet a aussi été démontré *in vivo* sur un modèle de xénogreffe<sup>227</sup>, il induit une inhibition significative de la prolifération et de l'invasion sur le modèle MDA-MB-231, hautement métastatique. Cette inhibition de l'invasion serait en partie liée à la baisse d'expression des MMP-2 et de l'uPA (urokinase Plasminogen Activator). L'EC50 de l'UA sur la lignée Walker 256 a été mesuré à  $9,5.10^{-4}$  mol/L (Figure 39-C).

## 2.2. EC50 des molécules anti-angiogéniques (Fingolimod et Sutent®)

Au sein de l'équipe, le potentiel de deux agents anti-angiogéniques, le SU et le Fingolimod (FTY720, Gilenya), a été étudié. Le Fingolimod est un analogue de la S1P (sphingosine 1 phosphate) susceptible de bloquer le signal passant par deux de ses récepteurs (S1P1 et S1P3), connus pour leurs rôles dans le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses par l'endothélium<sup>228</sup>. Le Fingolimod a reçu en 2010 une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) pour le traitement de la sclérose en plaque, mais un certain nombre de travaux, dont ceux de notre laboratoire, tendent à démontrer son effet cytotoxique et anti-angiogénique sur la tumeur. Le SU (Cf. Partie I.2.2.2.3. "Sunitinib") est un inhibiteur des récepteurs à activité tyrosine kinase ciblant principalement le VEGFR, PDGFR et FGFR<sup>117</sup> dont le rôle est avéré tant sur la croissance tumorale que sur le développement vasculaire. Le SU ne possède pas encore d'indication pour le cancer du sein, mais a déjà été testé sur des

modèles animaux. Etant donné que leur action ne se limite pas aux cellules vasculaires, nous avons évalué le potentiel cytotoxique de ces deux agents. L'EC50 du Fingolimod et du SU sur la lignée Walker 256 ont été de  $8,5 \cdot 10^{-6}$  mol/L et  $8,5 \cdot 10^{-5}$  mol/L (Figure 40).



**Figure 40: Détermination des concentrations efficaces 50 (EC50) des molécules anti-angiogéniques sur la lignée Walker 256 à 48 h et 72 h.** Après avoir été traitées avec des concentrations croissantes d'actifs le nombre de cellules viables a été compté avec un Scepter Cell Counter (Millipore). Les comptages ont été réalisés en triplicats pour chaque condition.

### 2.3. Discussion des valeurs d'EC50 des différentes molécules

Nous pouvons classer les molécules en fonction de leur efficacité anti-proliférative (Table 12).

Agents cytotoxiques	EC 50 obtenus en mol/L
Paclitaxel (PTX)	$8 \cdot 10^{-7}$
Fingolimod (FTY)	$8,5 \cdot 10^{-6}$
Roscovitine	$3 \cdot 10^{-5}$
Sunitinib (SU)	$8,5 \cdot 10^{-5}$
Acide ursolique (UA)	$9,5 \cdot 10^{-4}$

**Table 12 : Valeurs d'EC50 de différentes molécules anticancéreuses, sur la lignée Walker 256.**

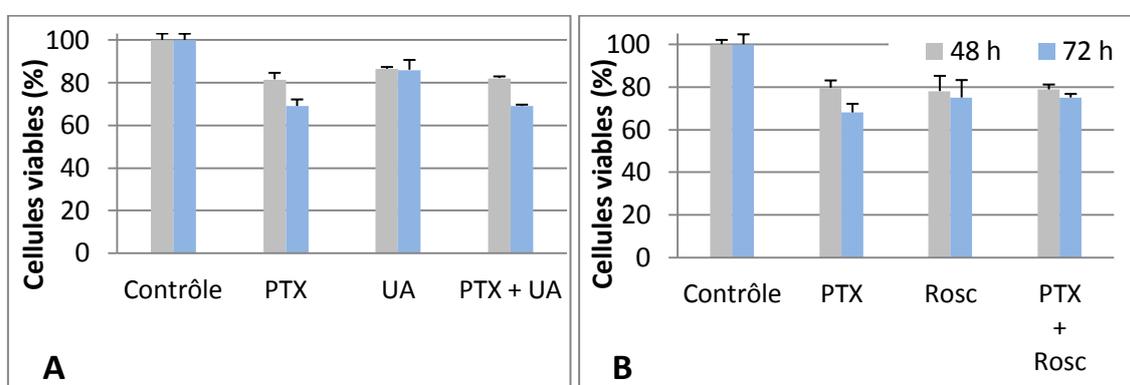
La molécule la plus efficace, avec un EC50 de  $8.10^{-7}$  mol/L, est le PTX. A doses égales le PTX est environ 10 fois plus efficace que le FTY, 40 fois plus que la Roscovitine, 100 fois plus que le Sunitinib et 1000 fois plus efficace que l'UA. L'UA, est dans le cadre de la lignée Walker 256, la molécule la moins efficace. De plus il possède une fenêtre thérapeutique très étroite, entre  $9.10^{-4}$  et  $1.10^{-5}$  mol/L. Travailler avec l'UA sur le modèle Walker 256, nécessiterait d'injecter de très fortes doses, et avec peu de marge, les risques de toxicité générale seraient accrus. Cependant, le combiner au PTX, pourrait permettre de réduire fortement les doses utilisées. La Roscovitine n'inhibe pas fortement la prolifération cellulaire, néanmoins comme le PTX, le FTY et le SU, sa fenêtre thérapeutique est large, le ratio effet/dose est progressif. Les EC50 de certaines molécules sont très élevés, néanmoins, leur action n'a été testée qu'en terme de prolifération cellulaire, or avec un EC50 50 fois inférieur à celui du PTX, la Roscovitine est en phase d'évaluation clinique. Il faut donc faire attention au fait que l'EC50 n'est pas forcément le meilleur test pour évaluer l'efficacité anticancéreuse d'une molécule. C'est pourquoi nous avons évalué toutes les combinaisons de ces molécules avec le PTX.

La détermination des valeurs d'EC50, nous a permis de choisir les concentrations à utiliser dans les expériences de combinaisons ultérieures. Afin d'éviter de masquer l'effet potentiel des différentes combinaisons de traitement, nous avons choisi d'utiliser des doses correspondant au  $10^{\text{ème}}$  de l'EC50. Le PTX étant l'objet d'étude principal, nous l'avons combiné à toutes les autres molécules cytotoxiques (Acide Ursolique, Fingolimod, Roscovitine, Sunitinib).

### 3. Combinaisons de chimiothérapies

#### 3.1. Combinaisons PTX/UA et PTX/Roscovitrine

La prolifération des cellules Walker 256 traitées au PTX seul a été réduite de 20% (48h) à 35% (72h) (Figure 41 A-B). L'activité anti-proliférative de l'UA (Figure 41-A) et de la Roscovitrine (Figure 41-B) seule n'a pas évolué avec le temps d'incubation, elle est restée autour de 18% à 48h et 72h. Ces combinaisons n'ont pas apporté de bénéfice par rapport au PTX seul en terme de prolifération (Figure 41 A-B).



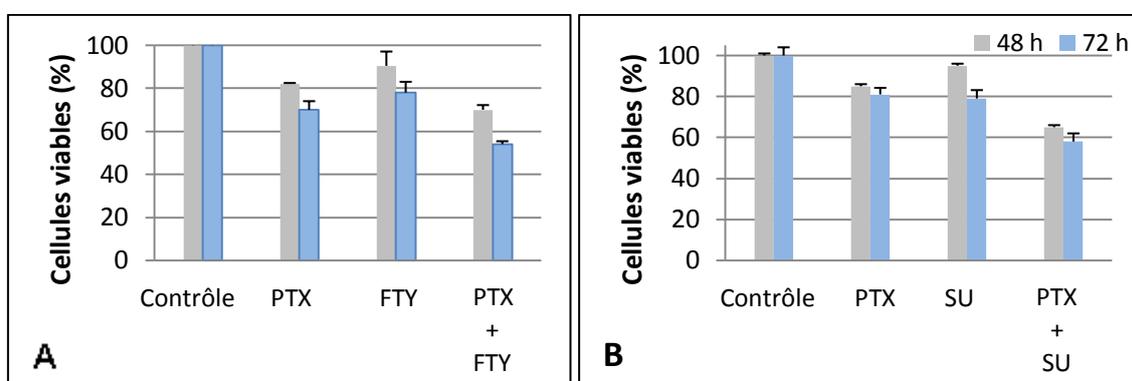
**Figure 41 : Activité anti-proliférative du Paclitaxel seul et combiné à l'Acide Ursolique (UA) ou à la Roscovitrine (Rosco).** (A) Prolifération des cellules Walker 256, en présence de PTX ( $10^{-8}$  mol/L) et/ou UA ( $10^{-5}$  mol/L) pendant 48 et 72h. (B) Prolifération des cellules Walker 256, en présence de PTX ( $10^{-8}$  mol/L) et/ou Roscovitrine ( $10^{-6}$  mol/L) pendant 48 et 72h.

#### 3.2. Combinaisons PTX/FTY et PTX/SU

##### 3.2.1. Efficacité anti-proliférative de ces combinaisons

Les résultats obtenus pour le PTX seul ( $10^{-8}$ mol/L) (Figure 41 A-B) sont très similaires à ceux obtenus lors de l'étude précédente ou il a été combiné avec la Roscovitrine et l'UA. Cela met en évidence le caractère reproductible de nos expériences. Le PTX seul a permis l'obtention d'une inhibition de la prolifération cellulaire allant de 20% (48 h) à 35% (72 h) (Figure 41 A-B). Cet effet anti-prolifératif n'a pas été significativement différent de ceux du SU et du Fingolimod (FTY) seul qui induisent une inhibition de la prolifération cellulaire allant de 15% (48 h) à 23% (72 h) (Figure 42 A-B). La combinaison des molécules que ce soit PTX/SU ou PTX/FTY ont induit une inhibition de la prolifération cellulaire de 50% soit deux fois plus

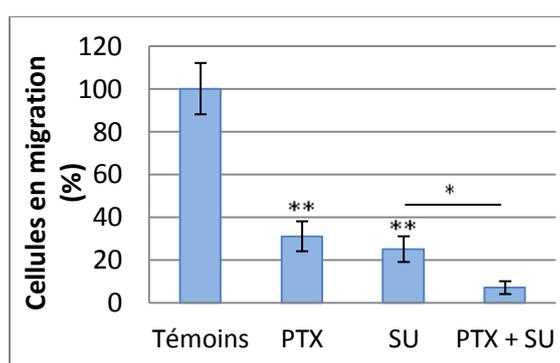
importante que celles obtenues avec les molécules seules. L'effet anti-prolifératif de ces deux molécules combinées au PTX sur la lignée cellulaire Walker 256 a été additif.



**Figure 42 : Activité anti-proliférative du Paclitaxel seul et combiné au Fingolimod et au Sutent®.** (A) Prolifération des cellules Walker 256, en présence de PTX ( $10^{-8}$  mol/L) et/ou Fingolimod ( $10^{-7}$  mol/L) pendant 48 et 72h (B) Prolifération des cellules Walker 256, en présence de PTX ( $10^{-8}$  mol/L) et/ou SU ( $10^{-7}$  mol/L) pendant 48 et 72 h.

### 3.2.2. Effet de la combinaison PTX/SU et PTX/FTY sur la migration cellulaire

Le test de migration cellulaire en gel d'agarose (Fiche Technique n°11) a été développé au sein de notre laboratoire<sup>229</sup>. Nous avons pu remarquer que le PTX, le SU et le FTY ont eu un impact sur la migration des cellules Walker 256. En comparant aux témoins, lorsque les cellules ont été traitées avec le PTX et le SU, environ 3 fois moins de cellules ont migré. La combinaison de traitement a apporté une amélioration puisque seulement 5% des cellules traitées ont migré.



**Figure 43 : Effet du Paclitaxel et du Sutent® seul et en combinaison sur la capacité migratoire des cellules Walker 256.**  $1,5 \cdot 10^4$  cellules Walker 256 ont étéensemencées dans le puits central d'un système de puits à couloirs. Le PTX ( $10^{-8}$  mol/L) et le SU ( $10^{-7}$  mol/L) seul ou en combinaison ont ensuite été ajoutés, ainsi que le sérum de veau dans un des 2 puits extérieur. Le 8<sup>ème</sup> jour, le nombre de cellule ayant migré a été évalué à l'aide du microscope LEICA DMIRB. Les cellules ayant migré sans avoir subi de traitement représentent notre condition Témoin. (\* $p < 0.05$  vs. aux conditions PTX et SU et \*\* $p < 0.01$  vs. aux témoins)

### 3.3. Discussion concernant les différentes combinaisons

En comparant l'effet des différentes combinaisons testées, nous avons remarqué que certaines associations n'apportaient pas de bénéfice sur le contrôle de la prolifération cellulaire de la lignée Walker 256 par rapport au traitement PTX seul. C'est le cas pour les combinaisons PTX/Roscovitine et PTX/UA où les effets combinés s'apparentent à l'effet du PTX seul. Ces agents cytotoxiques ont des mécanismes d'action proches, tous induisent l'expression de p53 qui active la transcription et la synthèse de la protéine p21, un inhibiteur du cycle cellulaire<sup>230</sup>. Ainsi, ces trois molécules induisent un arrêt du cycle cellulaire. Le PTX et la Roscovitine bloquent la cellule en phase G2/M<sup>231</sup> et l'UA en phase G2/M ou G1 selon les types de tumeurs. Le processus apoptotique qui en découle, se caractérise par une cascade d'évènements biochimiques et moléculaires. Ces mécanismes peuvent être initiés par une variété de signaux intra- ou extra-cellulaires. L'activation de la voie de transduction du signal pro-apoptotique dépend du type cellulaire et du stress. Les récepteurs membranaires activent la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort<sup>232,233</sup> et les mitochondries sont au centre de l'activation de la voie intrinsèque<sup>234</sup>. Quelle que soit la molécule utilisée (PTX, Roscovitine, UA) la voie intrinsèque de l'apoptose est activée. Ces trois agents cytotoxiques induisent donc le blocage du cycle cellulaire puis l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose, cette hypothèse permettrait d'expliquer pourquoi nous n'avons pas eu d'additivité des effets.

En revanche, lorsque le PTX est combiné au SU ou au FTY qui utilisent des mécanismes d'action différents, on obtient bel et bien une additivité d'effets. L'association entre une molécule cytotoxique et un agent anti-angiogénique est une pratique dont les effets en clinique permettent très nettement d'augmenter la survie des patients<sup>235</sup>. De plus, contrairement au PTX, le SU n'agit pas directement sur le cycle cellulaire puisque c'est un analogue de l'ATP avec qui il entre en compétition pour le site catalytique des récepteurs à activité tyrosine kinase. L'effet anti-angiogénique du SU est exploré et démontré depuis plusieurs années<sup>117,118</sup> (Cf. Partie I.2.2.2.3. "Sunitinib"). Plus récemment, un rapport de biopsie provenant d'une tumeur gastro-intestinale de patient traité au SU montrait une réponse sous forme de nécrose mais qui n'était pas associée à une réduction de la vascularisation tumorale<sup>236,237</sup>. Cet effet direct sur les cellules tumorales passe par l'inhibition de Stat3, fréquemment surexprimé dans les tumeurs<sup>189</sup>. Le FTY est un analogue

de la S1P. La S1P est surexprimée dans de nombreux cancers (dont le cancer du sein)<sup>238</sup> et impliquée non seulement dans la vascularisation tumorale mais aussi dans la croissance, la survie et la migration des cellules cancéreuses<sup>239</sup>.

Au terme de ces tests de combinaisons, celle qui a retenue le plus notre attention est la combinaison PTX/SU. En effet, ces deux molécules possèdent déjà une autorisation de mise sur le marché pour le traitement du cancer. Si notre travail sur une nouvelle forme galénique de cette combinaison s'avérait améliorer leurs effets antitumoraux, un développement en médecine vétérinaire, voir en médecine humaine pourrait être envisagé.

# PROJET N°3: DETERMINATION DU TYPE DE POLYMERE UTILISE

---

## **Problématique :**

Le MedinGel™ est un copolymère de PEG et de PLA qui peut être modulé en fonction de la longueur de la chaîne de PEG et le ratio PEG/PLA. En faisant varier ces paramètres, il est possible d'ajuster la vitesse de relargage du principe actif qu'il contient. Nous avons cherché à évaluer l'effet *in vivo* de cette nouvelle forme galénique. Notre modèle animal étant particulièrement agressif, nous avons recherché une forte libération de PTX au cours des premières heures (phase d'attaque de la tumeur/dose de charge), puis une libération continue au cours des jours suivants. Les tests de relargage *in vitro* réalisés ont eu une valeur indicative sur le comportement de relargage du PTX incorporé et ont permis de choisir le polymère le plus adapté pour les essais animaux.

## **Méthodes :**

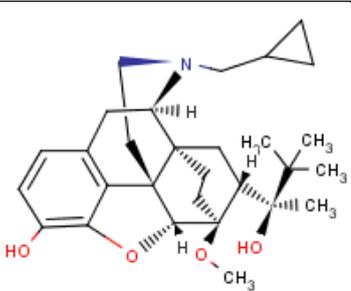
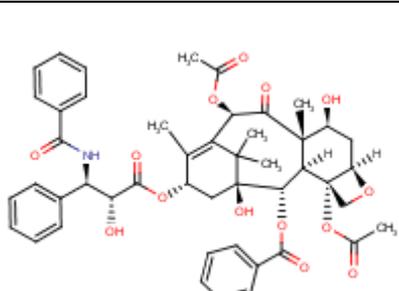
- Préparation des polymères (Fiche Technique n°12)
- Réalisation d'une cinétique de relargage *in vitro* (fiche Technique n°13)
- Méthode de dosage du PTX par HPLC-UV (Fiche Technique n°14)
- Méthode de dosage du SU par HPLC-MS-MS (Fiche Technique n°15)

## **Résultats :**

Le P6R1 permet de relarguer le PTX avec une libération importante sur les 24 premières heures puis de manière progressive sur une dizaine de jours, c'est pourquoi il a été choisi pour les phases de développement *in vivo*.

## 1. Problématique

L'entreprise MedinCell, avec laquelle nous sommes en collaboration sur ce projet, ne possédait pas de données sur le comportement du PTX une fois intégré au polymère. Les données les plus proches dont nous disposions étaient basées sur l'expérience acquise par MedinCell avec la Buprénorphine (Table 13). Les données acquises sur le relargage de cette molécule nous ont permis de réduire le nombre de polymères à tester. C'est pourquoi les polymères choisis ont une taille de 600 kDa. Nous avons fait varier les ratios de PLA/PEG et les concentrations de polymères afin de choisir la formulation la plus adéquate. Nous avons pu tester 4 polymères différents le P6R1, le P6R2.2, le P6R2.6 et le P6R4.

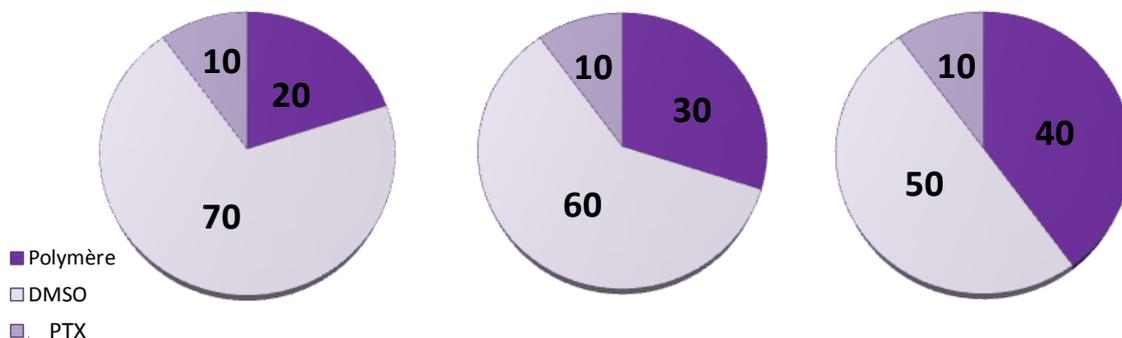
	Buprénorphine	Paclitaxel
Molécule		
Formule	C <sub>29</sub> -H <sub>41</sub> -N-O <sub>4</sub>	C <sub>47</sub> -H <sub>51</sub> -N-O <sub>14</sub>
Taille (kDa)	467.7	853.9
Solubilité aqueuse	0.6 mg/L	0.3 mg/L
Log P	4.7	4.9

**Table 13 : Comparaison entre la Buprénorphine et le Paclitaxel.**

## 2. Etude du relargage du Paclitaxel

### 2.1. Relation entre la quantité de polymère et le relargage du Paclitaxel

Afin d'évaluer l'influence du pourcentage de polymère de l'injectat (m/m) sur la libération du PTX, nous avons étudié le relargage du PTX lorsque l'injectat contenait une masse de polymère équivalente à 20, 30 et 40% de la masse totale (Fiche Technique N°12 et 13).



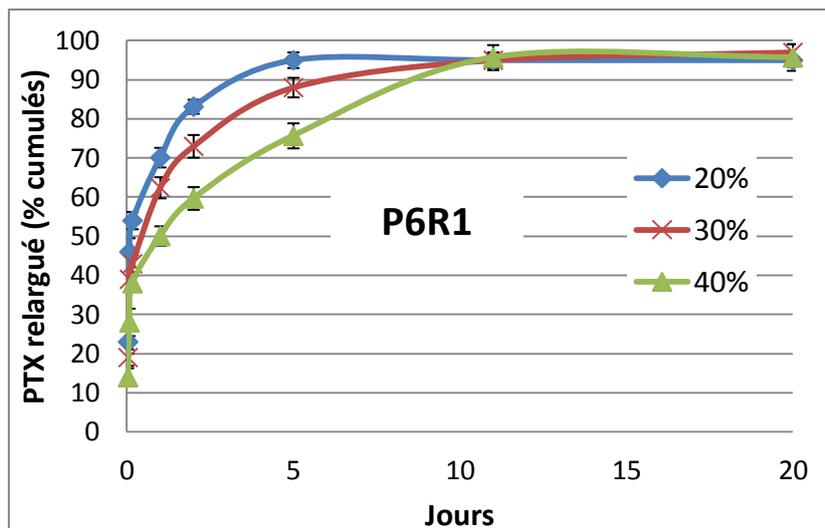
**Figure 44 : Différentes compositions des polymères utilisées.** Exprimée en pourcentage de la masse totale.

Par la suite, pour simplifier, lorsque nous parlerons de polymère à 20%, cela signifiera que la masse du polymère représente 20% de la masse totale de l'injectat (Figure 44).

- **Relation entre la quantité de polymère P6R1 et le relargage du Paclitaxel**

Pour le polymère P6R1, nous avons observé une libération importante au cours des 48 premières heures pour les 3 concentrations de polymère puisque 50 à 80% du PTX ont été libéré. Puis une libération plus progressive a été observée en particulier pour le polymère à 40% (Figure 45). La forte libération de PTX qui fait suite au dépôt du PTX incorporé en polymère dans le milieu de relargage est liée au changement de structure causé par l'hydratation du polymère. Pour le polymère P6R1, la libération initiale a été inversement proportionnelle à la masse de polymère. Au cours des 48 premières heures pour le polymère à 20%, la quantité de PTX qui a été libérée atteint 70% alors que pour le polymère à 40% cette quantité ne dépasse pas 50%.

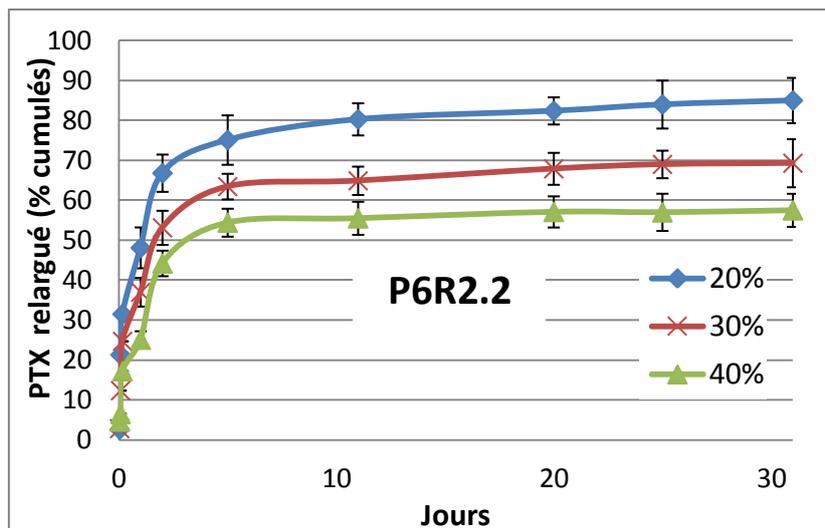
Les échantillons avec la plus faible teneur en polymère (20%) libèrent l'intégralité du PTX en 5 jours, alors qu'il faut attendre le 10<sup>ème</sup> jour pour les échantillons contenant 30 et 40% de polymère.



**Figure 45 : Corrélation entre la quantité de polymère P6R1 et le relargage du Paclitaxel.** Les quantités de PTX ont été mesurées par HPLC-UV. La quantité de polymère représentait 20, 30 ou 40% de la masse totale de l'injectat.

- **Relation entre la quantité de polymère P6R2.2 et le relargage du Paclitaxel**

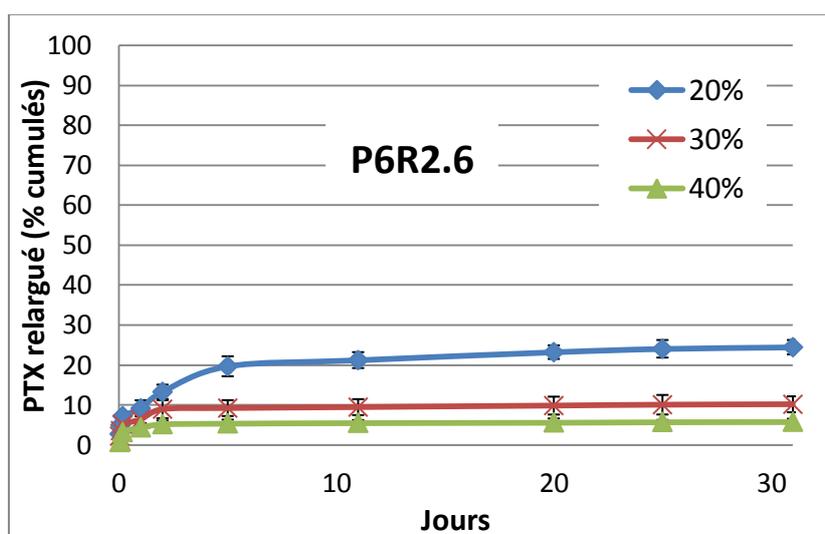
Lorsque le PTX a été incorporé dans un polymère avec un ratio PEG/PLA de 2,2, nous obtenons comme dans le cas précédent, une vitesse de relargage directement liée à la teneur en polymère (Figure 46). Pour les différentes teneurs en polymère (20-30 et 40%), le burst s'est étalé sur les 24 premières heures. Puis la libération de PTX s'est réduite progressivement entre 24 et 120 heures pour s'arrêter après le 10<sup>ème</sup> jour et ce quel que soit le pourcentage de polymère.



**Figure 46 : Corrélation entre la quantité de polymère P6R2.2 et le relargage du Paclitaxel.** Les quantités de PTX ont été mesurées par HPLC-UV. La quantité de polymère représentait 20, 30 ou 40% de la masse totale de l'injectat.

- **Relation entre la quantité de polymère P6R2.6 et le relargage du Paclitaxel**

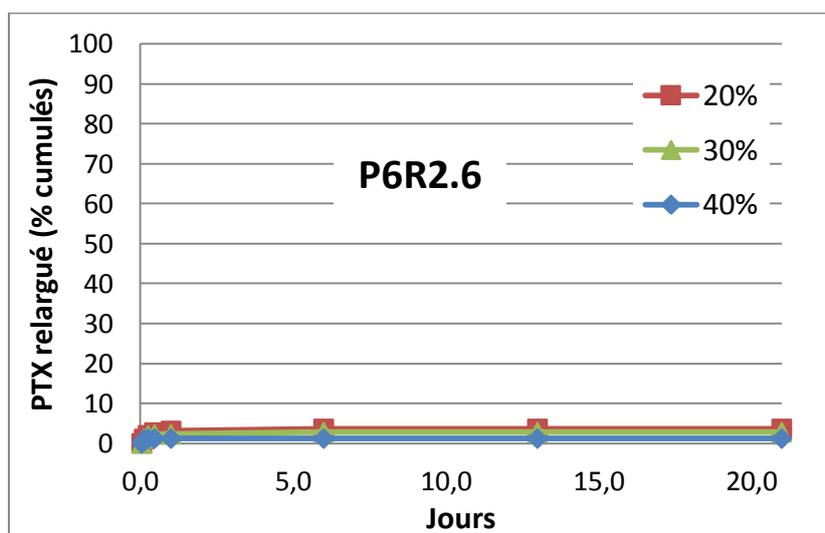
Le PTX a été incorporé dans un polymère possédant un ratio PEG/PLA plus élevé que précédemment (2,6 vs. 2,2 et 1). Pour la plus faible teneur en polymère (20%) moins de 25% de PTX a été relargué au terme des 30 jours. Après le 5<sup>ème</sup> jour, 20% de la dose totale avait été libérée (Figure 47). Pour les quantités de polymère représentant 30 et 40%, environ 10% de la dose de charge de PTX a été libéré en 48 h sans qu'aucun relargage supplémentaire n'est pu être détecté par la suite.



**Figure 47 : Corrélation entre la quantité de polymère P6R2.6 et le relargage du Paclitaxel.** Les quantités de PTX ont été mesurées par HPLC-UV. La quantité de polymère représentait 20, 30 ou 40% de la masse totale de l'injectat.

- **Relation entre la quantité de polymère P6R4 et le relargage du Paclitaxel**

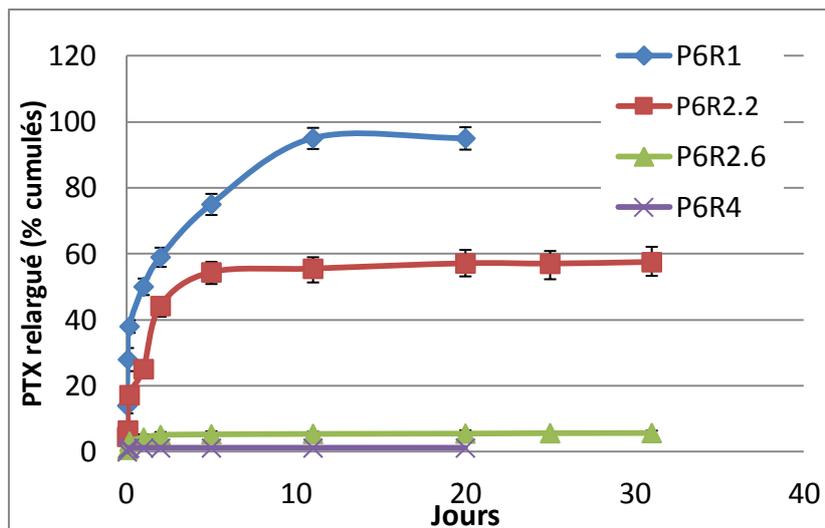
Dans le polymère P6R4 seule une quantité négligeable de PTX a été libérée dans le milieu (Figure 49). En effet, quelle que soit la concentration de polymère (20, 30 ou 40%), moins de 3% de la dose totale de PTX ont été relargués sur 20 jours. Ces 3% ont été libérés au cours des premières 24 heures, puis le PTX est resté piégé dans le polymère.



**Figure 48 : Corrélation entre la quantité de polymère P6R4 et le relargage du Paclitaxel.** Les quantités de PTX ont été mesurées par HPLC-UV. La quantité de polymère représentait 20, 30 ou 40% de la masse totale de l'injectat.

## 2.2. Relation entre le ratio PEG/PLA et le relargage du Paclitaxel

La Figure 48 est une compilation des résultats de relargage du PTX incorporé aux différents polymères (P6R1 à 4) à 40%. On peut conclure que ces courbes de relargage établies *in vitro* nous donnent une idée de la stabilité des polymères. En effet, plus le ratio PEG/PLA augmente, plus le mélange polymère-PTX est stable et moins le PTX est libéré dans le milieu aqueux. En effet, au 20<sup>ème</sup> jour lorsque l'intégralité de la dose totale est relarguée pour P6R1, seulement 50% l'a été pour P6R2.2, 5% pour P6R2.6 et 1% pour P6R4 (Figure 49).



**Figure 49 : Relation entre le ratio PEG/PLA du polymère et le relargage du Paclitaxel.** Les quantités de PTX ont été mesurées par HPLC-UV. Pour chacun des polymères, a été choisi les valeurs pour une masse de polymère de 40%.

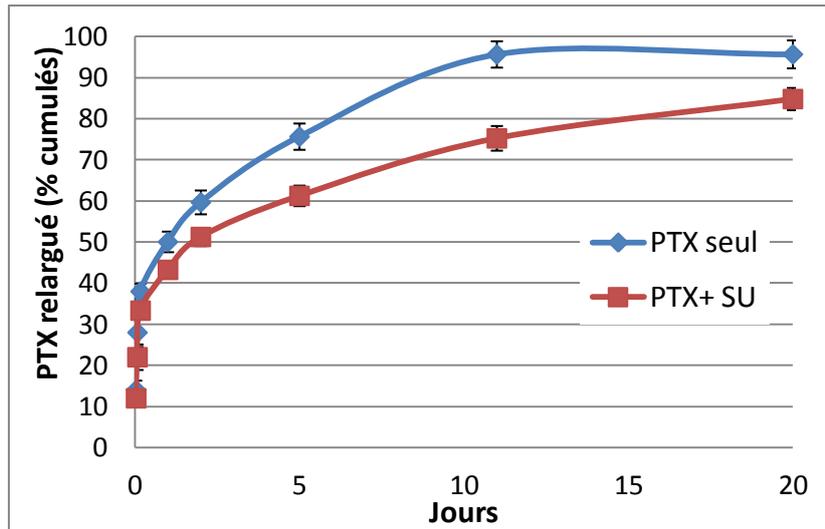
### 2.3. Corrélation entre le nombre d'actifs incorporés dans le polymère et leurs vitesses de relargage

Ces tests de relargage sont réalisés à l'aide du polymère P6R1 à 40%, dont la cinétique de relargage se rapproche le plus de nos attentes.

- **Mesure du relargage du Paclitaxel**

Le SU, est l'agent cytotoxique avec lequel le PTX possède le meilleur effet additif (Cf. Projet 2, Partie 3.2 Combinaisons PTX/FTY et PTX/SU). De plus, cet agent est lui aussi hydrophobe ( $\log P \approx 2$ ). Une combinaison au sein du polymère a pu être envisagée, nous avons donc évalué le relargage du PTX en présence de SU. La présence de SU modifie-t-elle le relargage du PTX ?

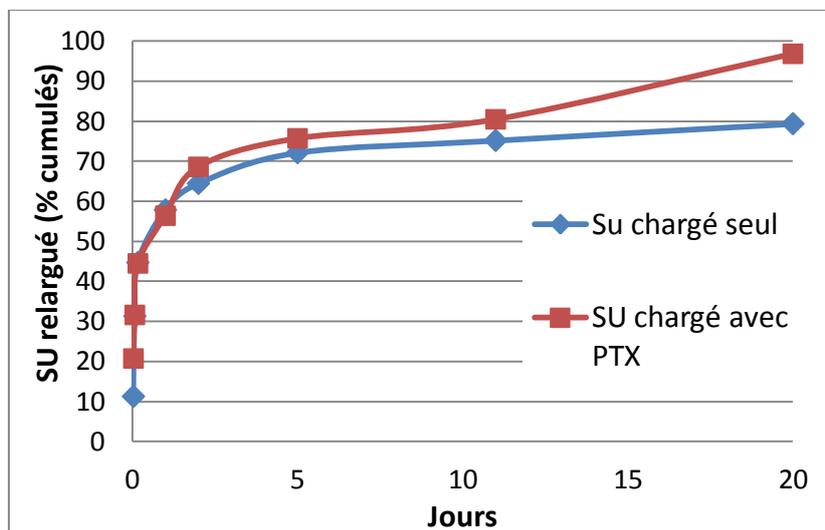
La présence de SU dans le polymère a légèrement réduit la vitesse de relargage du PTX (Figure 50). Au 11<sup>ème</sup> jour, 95% de la dose totale de PTX est relarguée, alors que moins de 75% de PTX sont relargués lorsqu'il est intégré avec le SU.



**Figure 50 : Corrélation entre l'adjonction du Sutent® dans le polymère et le relargage du Paclitaxel.** Le polymère utilisé est le P6R1, la masse de polymère par rapport à la masse de l'injectat est de 40%.

- **Mesure du relargage du Sutent®**

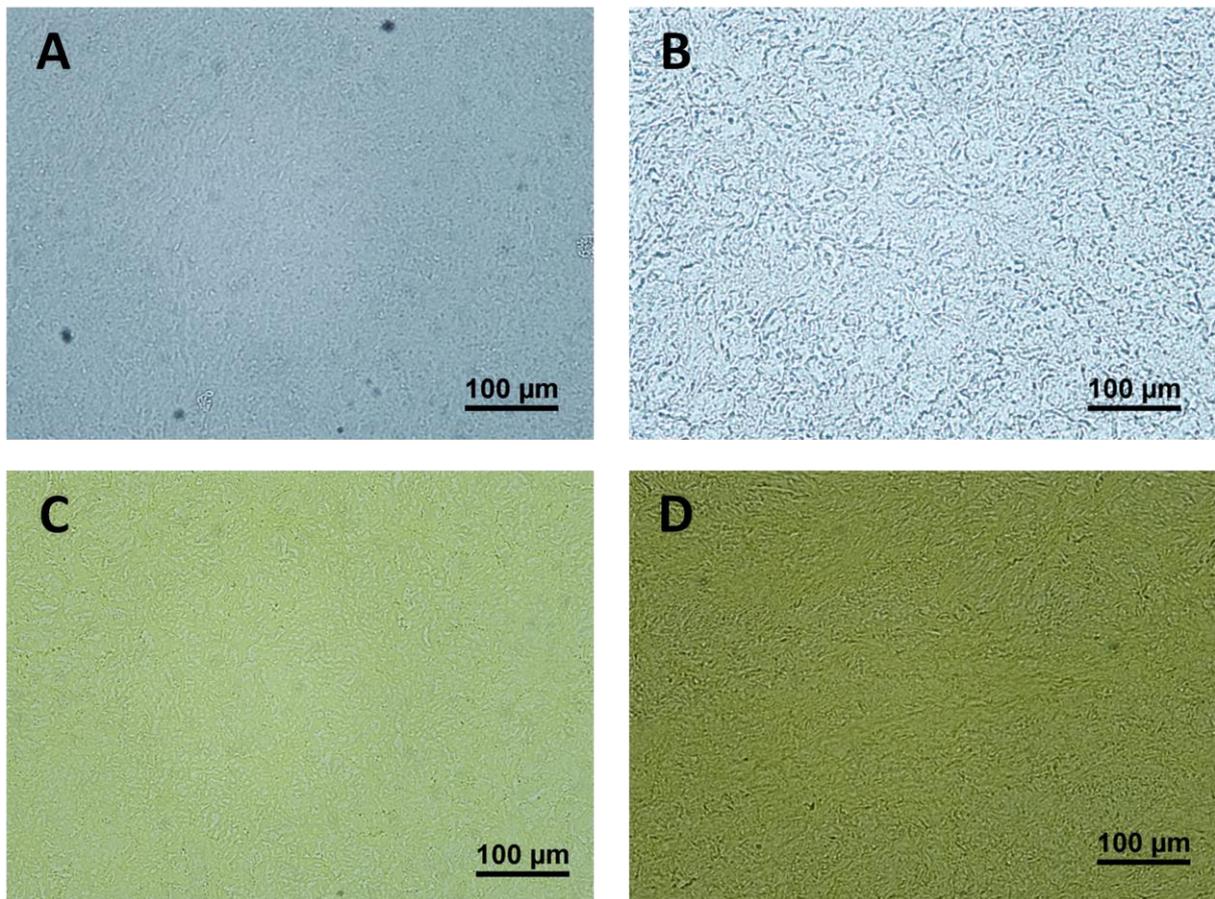
De la même manière, nous avons évalué le relargage du SU seul et en combinaison avec le PTX. Contrairement au PTX, le SU a été relargué de manière similaire, qu'il soit incorporé seul ou en présence de PTX au sein du polymère (figure 51).



**Figure 51 : Corrélation entre l'adjonction du Paclitaxel dans le polymère et le relargage du Sutent®.** Le polymère utilisé est le P6R1, la masse de polymère par rapport à la masse de l'injectat est de 40%.

#### 2.4. Caractérisation microscopique du polymère P6R1

Une fois que les solutions de polymère et les différentes molécules ont été mises en contact, ces dernières ont été captées au sein de son maillage (Figure 52). Pour le polymère seul, le maillage est homogène, il est constitué de petits agrégats (Figure 52-A). Lorsque le PTX est ajouté, la structure est modifiée, on observe alors la formation d'amas de taille plus importante (Figure 52-B). La structure obtenue avec le SU seul est encore différente (Figure 52-C), la forme du maillage est similaire à celui du polymère seul, mais semble plus lâche. Enfin, la combinaison des deux molécules entraîne la formation d'une structure mixte entre les réseaux obtenus avec le PTX seul et le SU seul (Figure 52-D).



**Figure 52 : Structure du polymère chargé avec les différentes molécules.** Les coupes ont été obtenues après congélation du polymère et passage au cryostat. (A) Polymère seul, (B) Polymère + PTX, (C) Polymère + SU, (D) Polymère + Combinaison.

### 3. Injectabilité du polymère

Le polymère testé quelle que soit sa concentration (20, 30 ou 40%) a été injectable. En effet, une simple aiguille de 23 Gauge a suffi pour l'injection du dépôt. La consistance de la formulation du polymère/chimiothérapies est visqueuse. Une fois formé dans le milieu de relargage (Fiche Technique n°13) le Krebs Ringer Tris (KRT), il a été possible d'observer les effluves du DMSO (solvant) dans le milieu de relargage. Cette étape correspond au remplacement des molécules de DMSO par les molécules d'eau (échange de phase).

### 4. Discussion sur le choix du polymère

A travers les différents tests de relargage du PTX, il a été démontré que le pourcentage de polymère contenu dans l'injectat et le ratio PLA/PEG, modifiaient la libération du PTX. En effet, plus ils augmentent, plus le mélange polymère/PTX est stable et plus la quantité de PTX relargué est faible. Cependant, il est important de noter que sur la plupart des courbes de relargage nous n'atteignons pas les 100% de PTX relargué. A l'issue de chaque test de relargage, le reliquat de polymère a été dissous dans l'acétonitrile, et la quantité de PTX encore piégée dans le polymère a été dosée. De manière globale, les quantités cumulées de PTX obtenues atteignent 80-90% de la dose totale initiale. Cette perte de PTX peut être attribuée à plusieurs facteurs. (i) Nous pouvons supposer qu'une partie du PTX est adsorbée par les tubes en plastique dans lesquels sont effectués les expériences de relargage *in vitro*. (ii) La solubilité du PTX étant faible dans ce milieu, on peut envisager qu'une partie du PTX ait précipité dans le KRT, (iii) ou encore, bien qu'il soit relativement stable dans la plupart des solvants il est possible qu'une partie du PTX ait pu être dégradée.

Connaitre le comportement du PTX au sein des différents polymères nous a permis de choisir celui qui présentait le potentiel de relargage le plus adapté à nos besoins pour l'évaluation *in vivo*. En effet, notre modèle Walker 256 (Cf. Projet n°1 Modèle Animal) étant particulièrement agressif, nous recherchions une libération importante de PTX au cours des premières heures (dose de charge), puis une libération continue au cours des jours suivants. Le P6R1 avec un pourcentage de polymère représentant 40% de la masse totale de l'injectat a été retenu. *In vitro*, 50% de la dose de charge de PTX est libérée en 48h, puis le reste dans les 5 jours qui suivent. La dégradation du PLA peut se faire par la simple hydrolyse de la liaison ester<sup>240,241</sup>. Néanmoins, le relargage *in vitro* reste limité car il ne tient pas compte ni

des phénomènes mécaniques entre le polymère et les tissus des animaux tels que les frottements de la peau<sup>242</sup>, la pression des tissus, ni de la dégradation enzymatique du polymère. Il est probable que la dégradation du polymère et *a fortiori* la libération de PTX soient différentes. De nombreuses équipes ont étudié les différences entre la dégradation *in vitro* et *in vivo*<sup>243,244</sup>. Chegini et al, par exemple ont comparé la dégradation du Lactomer® (fils de sutures résorbable, polymère de type PLA<sub>70</sub>/GA<sub>30</sub>) en l'implantant sur des lapins et en l'incubant dans un tampon salin type PBS. La dégradation a été plus rapide *in vivo* qu'*in vitro*. La différence peut être liée à l'effet des enzymes cellulaires ou d'autres facteurs biologiques ou biochimiques ainsi que le stress mécanique causé par les mouvements du lapin. Therin<sup>243</sup> et al. trouvèrent aussi que la dégradation *in vivo* était plus rapide. Les différences ont été assimilées au stress mécanique entraîné par les contractions musculaires du lapin. L'influence enzymatique sur la dégradation du polymère est en revanche contestée. De plus, il est probable que la dégradation du polymère induise une réaction inflammatoire, au niveau du site d'injection, qui entrainerait la formation d'une capsule fibreuse autour du site d'injection et la rétention de l'actif.

# PROJET N°4 : EVALUATION DE L'EFFICACITE DE LA COMBINAISON PACLITAXEL/SUTENT®

---

## **Problématique :**

Les associations entre les molécules anti-angiogéniques et les agents cytotoxiques sont reconnues pour augmenter le temps de survie sans progression de patients atteints du cancer du sein, du colon, et des poumons<sup>235</sup>. Au cours des tests de prolifération et de migration qui ont été réalisés précédemment (Projet n°2), l'association entre le PTX et le SU s'est avérée la plus efficace. Ainsi, nous avons poursuivi l'étude de cette combinaison *in vivo* afin de répondre aux questions suivantes :

- L'association du PTX et du SU apporte-t-elle un bénéfice par rapport aux molécules données séparément ?
- Le relargage local et prolongé par le MedinGel™ de la combinaison SU et PTX permet-il une amélioration de l'efficacité anti-tumorale par rapport aux modes d'administration classiques ?

## **Méthodes :**

- Greffe de cellules Walker 256 (Fiche Technique n°5)
- Suivi des animaux (Fiche Technique n°6)
- Pet Scan (Fiche Technique n°17)
- Euthanasie et autopsie (Fiche Technique n°7)
- Préparation de coupes histologiques (Fiche Technique n°8)
- Marquage de coupes histologiques (Fiche Technique n°9)

## **Résultats :**

La combinaison PTX/SU, soit par voie classique, soit par polymère, a permis d'obtenir la plus importante réduction de la croissance tumorale et la diminution de l'occurrence des métastases. De plus, l'utilisation du polymère pour le relargage local des principes actifs a permis d'augmenter l'efficacité antitumorale par rapport aux voies classiques d'administration. Lors de l'étude histologique des tumeurs, nous avons montré que l'effet antitumoral de la combinaison PTX/SU a induit une augmentation de l'apoptose intratumorale ainsi qu'une diminution de la vascularisation.

## 1. Problématique

Les résultats de tests de prolifération et de migration cellulaires *in vitro* (Projet n°2) avaient montré que la combinaison du PTX et du SU permettait d'obtenir l'inhibition de la prolifération de la lignée Walker 256 la plus importante. L'association d'une molécule anti-angiogénique avec une molécule cytotoxique est déjà utilisée en clinique<sup>90</sup>. En effet, la vascularisation tumorale est anarchique, entraînant une mauvaise distribution de l'oxygène et des agents thérapeutiques au sein de la tumeur. Après un traitement anti-angiogénique, la vascularisation de la tumeur tend à se normaliser : la désorganisation vasculaire est réduite et des péricytes et CMLs stabilisent les néovaisseaux. Cette normalisation de la vascularisation permet aux agents cytotoxiques d'être distribués de manière plus homogène au sein de la tumeur et par conséquent d'accroître leur efficacité. Pour tester l'efficacité antitumorale de notre combinaison du PTX et du SU, *in vivo*, nous avons procédé en plusieurs temps :

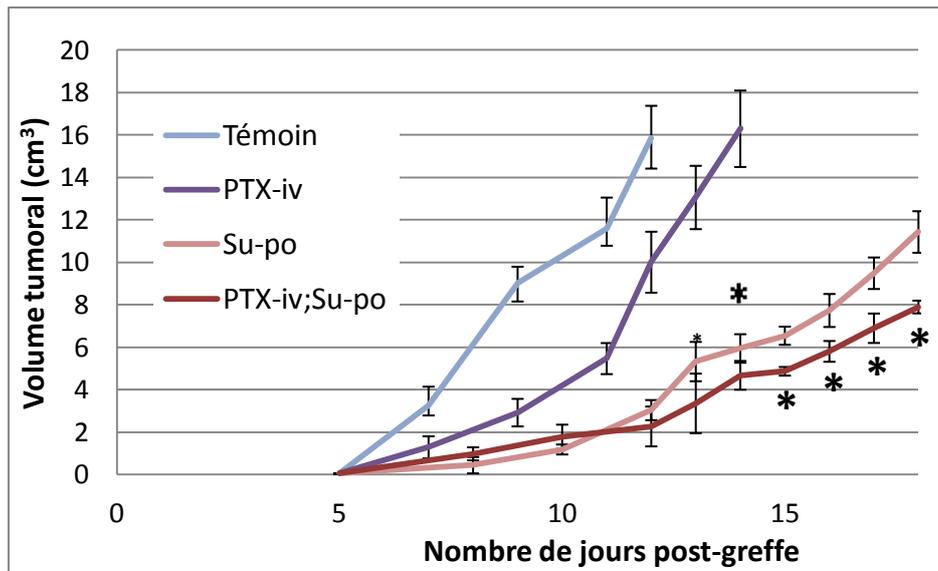
1. Evaluation de l'efficacité de la combinaison PTX + SU administrée par voie classique, sur la croissance tumorale
2. Détermination de la dose optimale de PTX incorporé en polymère pour des essais *in vivo*
3. Détermination de la fréquence d'injection du traitement
4. Evaluation de l'efficacité du traitement sur la croissance tumorale *in vivo* par la mesure du volume tumorale et par PET-Scan
5. Etude des effets histologiques du traitement

## 2. Evaluation de l'efficacité de la combinaison PTX/SU administrée par voie classique, sur la croissance tumorale

Après avoir observé que la combinaison entre le PTX et le SU donnait les meilleurs résultats *in vitro*, cet effet a été évalué *in vivo* en administration systémique. Pour cela, les animaux ont été greffés (Fiche Technique n°5), puis 4 groupes de 6 rats ont été constitués et traités, une fois les tumeurs détectées (J5)(Fiche Technique N°6), soit par Taxol® (10 mg/kg/2j en IV par la veine jugulaire), soit par SU (6 mg/kg/j, per os, gavage en huile d'olive) soit par la combinaison des 2 traitements, soit par aucun des 2 traitements. En utilisant la concentration de Taxol® de 10 mg/kg administrée tous les trois jours nous sommes placés dans les concentrations maximales tolérées par les rats Sprague-Dawley<sup>245</sup>.

Les tumeurs ont été détectées cinq jours après l'injection de  $10^4$  cellules Walker 256 de manière orthotopique. Pour les animaux non traités, le temps moyen de doublement des tumeurs a été de 1.8 jours. La vitesse de croissance des tumeurs a été très rapide, avec un volume tumoral moyen de  $16 \text{ cm}^3$  en 7 jours (Figure 53, et Table 14), obligeant à l'euthanasie des animaux pour raisons éthiques. Pour les animaux traités avec le Taxol® (formulation pour injection IV du PTX), nous avons constaté une diminution de la croissance tumorale et une augmentation de 30% de la durée de vie des animaux (48 heures). Ceci semble être directement lié à l'augmentation de 25% du temps de doublement des tumeurs par rapport aux animaux témoins (2.39 vs. 1.78 jours). Pour les animaux qui ont été traités avec le SU, la vitesse de croissance tumorale a été réduite puisque le volume tumoral moyen des animaux était de  $11 \text{ cm}^3$ , 18 jours après la greffe. Le temps moyen de doublement des tumeurs a été augmenté de 175% par rapport aux témoins, permettant la prolongation du temps de survie des animaux de 150% par rapport aux témoins (18 vs. 12 jours). Enfin, la combinaison des 2 traitements a permis d'obtenir les meilleurs résultats sur la croissance tumorale (Figure 53 et Table 14), avec un temps de doublement des tumeurs de 3.58 jours et un volume tumoral moyen de  $9 \text{ cm}^3$  18 jours après la greffe.

La combinaison PTX/SU ayant été efficace *in vivo* suite au traitement systémique, l'évaluation du traitement suite à l'administration locale a pu être réalisée.



**Figure 53 : Croissance tumorale après traitements par le Paclitaxel, le Sutent® et la combinaison administrés par voie classique.** Les rates âgées de 8 semaines ont reçu  $10^4$  cellules Walker 256. Les traitements ont commencé dès la détection de la tumeur, les animaux ont été gavés quotidiennement avec 6 mg/kg de SU, et/ou injectés par voie intraveineuse avec 10 mg/kg de Taxol® (Forme galénique du PTX) (\* $p=0.001$ ) tous les 2 jours.

Groupes	Survie (jours)	Temps de doublement moyen (jours)	Volume tumoral moyen à J12 (cm <sup>3</sup> )	Volume tumoral moyen à J18 (cm <sup>3</sup> )
Témoins	12	1.8	16	Rats euthanasiés
Taxol (PTX-IV)	14	2.39	10	Rats euthanasiés
SU-po	18	2.8	3.1	11.7
PTX-iv ; SU-po	18	3.1	2.2	8

**Table 14 : Récapitulatif des données de l'effet des traitements administrés de manière systémique.** Les statistiques ont été réalisées d'après le test statistique t de Student (\* $p<0.05$ ).

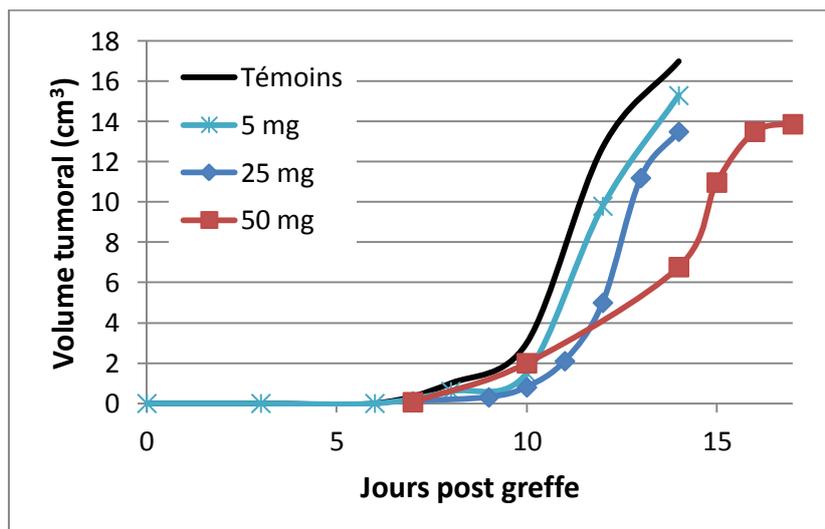
### 3. Détermination de la dose optimale de PTX incorporé en polymère pour des essais *in vivo*

Avant de réaliser l'expérience principale pour mesurer l'efficacité du polymère chargé en chimiothérapies, nous avons réalisé quelques expériences préliminaires pour déterminer la dose maximale de PTX et la fréquence d'injection possible pour le polymère.

### 3.1. Essai à 5, 25 et 50 mg de Paclitaxel dans le polymère

Notre modèle animal étant particulièrement agressif, une première étape a consisté à déterminer la quantité de PTX optimale à incorporer au polymère pour permettre un effet antitumoral. Pour mémoire, la dose totale de PTX que nous avons utilisé dans le test précédent était de 15 mg répartie en 6 injections IV (10 mg/kg/3j pendant 18 jours soit 6 injections de 2,5 mg).

Dans un premier temps une dose plus faible de PTX que celle correspondant à celle délivrée suite à son administration systémique a été testée, une dose totale de 5 mg de PTX incorporée dans 250  $\mu$ l de polymère (PTX-P). Les doses de 25 mg et 50 mg ont aussi été testées, pour voir si un effet supérieur était possible sans toxicité. La solubilité du PTX dans le DMSO étant limitée, la dose de 70 mg est la quantité maximale de PTX que nous ayons pu inclure dans le polymère. Cette dose correspondant à une charge maximale de PTX a été testée. Pour les deux premières doses (5 et 25 mg), nous n'avons observé aucune différence significative avec le groupe témoin concernant la croissance tumorale (Figure 54). En revanche, pour la dose de 50 mg de PTX-P, la croissance tumorale a été réduite par rapport aux témoins. Le ralentissement de la croissance tumorale a été plus important au cours des 13 premiers jours (7 premiers jours de traitement). Passé cette date, la tumeur a semblé échapper au traitement et reprenait une croissance rapide (courbe rouge).



**Figure 54 : Influence de la quantité de Paclitaxel incorporée au polymère.** Des rates Sprague Dawley âgées de 8 semaines ont reçu  $10^4$  cellules Walker 256. Les traitements ont commencé dès la détection de la tumeur (Jour 7), les animaux ont reçu une injection de PTX-P contenant 5, 25 ou 50 mg de PTX.

### 3.2. Discussion concernant les doses de PTX à injecter

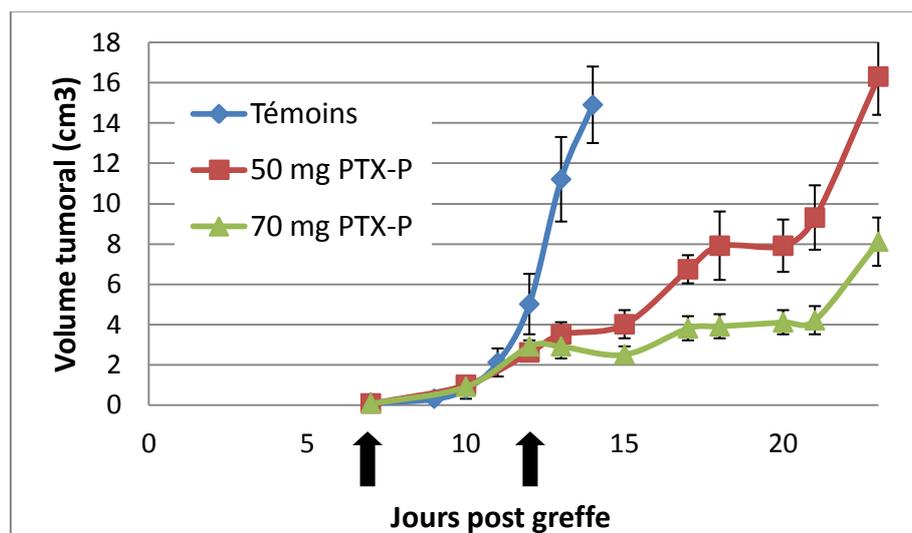
Lorsque les animaux ont été traités avec 5 et 25 mg de PTX-P, nous n'avons pas observé d'effet antitumoral. Les drogues étant délivrées de manière locale, nous pensons que les doses nécessaires de PTX pour le contrôle de la croissance tumorale seraient moins importantes. Plusieurs hypothèses pouvaient être envisagées :

- Les propriétés physico-chimiques du PTX, principalement son hydrophobicité, ont pu inhiber sa diffusion. Ainsi, le PTX est resté piégé au niveau du site d'injection et n'avait pas pu atteindre le site tumoral en quantité suffisante pour induire un effet antitumoral.
- La localisation péri-tumorale de l'injection n'a pas été optimale. En effet, le PTX-P a été injecté en périphérie de la tumeur, et, une fois libéré n'a peut-être pas diffusé de manière homogène dans toute la tumeur. La partie externe de la tumeur proche de l'hydrogel injecté a peut-être été atteinte mais pas la partie externe contro-latérale. Cette hypothèse semble vraisemblable au vu de certaines images obtenues au PET-Scan (nécrose unilatérale, Cf partie suivante). Cependant, il faut noter qu'initialement les injections intratumorales ont été préférées, mais ce type d'injection ayant entraîné le développement rapide de nombreuses métastases l'injection péri-tumorale a alors été envisagée. En effet, la pression créée par l'injectat en intra-tumoral a pu léser la pseudo-capsule tumorale et induire la diffusion de cellules tumorales.

Ainsi, une dose 50 mg de PTX a été efficace mais pendant une durée de 7 jours suivant le traitement. Cette reprise de la croissance tumorale après 7 jours pouvait être due à : (i) une dose injectée insuffisante pour permettre le contrôle de la croissance tumorale, (ii) une libération trop rapide de toute la dose de charge, (iii) une résistance acquise de la tumeur. Considérant que l'hypothèse la plus probable était qu'après 7 jours, tout le PTX contenu dans le gel avait été libéré, nous avons envisagé de renouveler l'injection de PTX-P, autour du 14<sup>ème</sup> jour post-greffe (5 jours après la première injection) afin de prévenir l'échappement de la tumeur.

#### 4. Détermination de la fréquence d'injection du polymère

Lorsque nous avons administré une dose unique de PTX-P à 50 mg, le temps de survie a été augmenté de 8 jours (Figure 54). Une seconde injection de 50 mg de PTX a permis d'augmenter le temps de survie des animaux de 14 jours par rapport aux animaux témoins (Figure 55) et de 5 jours par rapport à l'injection unique de 50 mg de PTX-P. Avec 70 mg de PTX-P la progression tumorale a été réduite par deux : le volume moyen des tumeurs 20 jours après la greffe était de 4 cm<sup>3</sup> vs. 8 cm<sup>3</sup> pour les animaux traités avec 50 mg de PTX (Figure 55). L'injection de deux doses de 70 mg de PTX a causé une inhibition de la croissance tumorale plus importante qu'avec 50 mg, néanmoins cette dose ne sera pas retenue du fait d'importantes lésions cutanées. Ainsi, pour les expériences ultérieures, la dose efficace de PTX choisie a été celle de 50 mg et une seconde injection a été réalisée 5 jours après la première.



**Figure 55 : Evaluation de l'intérêt de deux injections de polymères sur le contrôle tumoral.** Des rates Sprague Dawley âgées de 8 semaines ont reçu 10<sup>4</sup> cellules Walker 256. Les traitements ont commencé dès la détection de la tumeur (Jour 7), les animaux ont reçu deux injections de PTX-P à 50 ou 70 mg de PTX. Les flèches correspondent aux différents temps d'injections du polymère (J7 et J12 post-greffe).

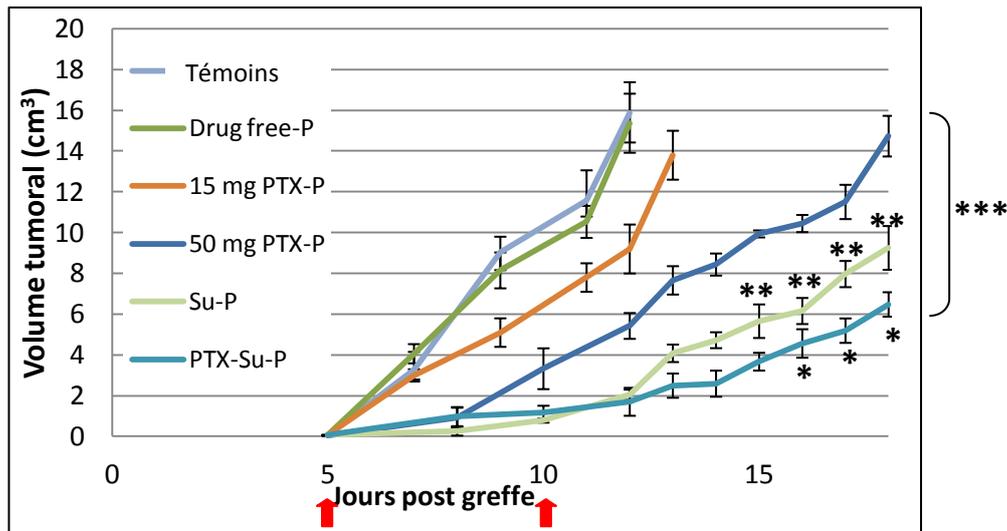
## 5. Evaluation de l'efficacité du traitement sur la croissance tumorale *in vivo*

Les doses de principe actif et les schémas thérapeutiques pour le PTX ayant été déterminés au cours des expérimentations précédentes, nous avons alors dû déterminer la dose de SU à incorporer. Afin de pouvoir comparer l'influence du mode d'administration, les doses de SU incorporées dans le polymère ont dû être calculées de manière à être du même ordre de grandeur que *per os*. Pour le SU, celui-ci est administré quotidiennement à 6 mg/kg par voie orale (gavage). Chaque jour une rate de 250 g ingère  $\approx$  1,5 mg de SU. En tenant compte de la biodisponibilité du SU qui est de 60% pour une femelle Sprague Dawley<sup>246</sup>, la dose réelle reçue par chaque rate est de 0.9 mg. Le polymère s'hydrolysant en 5 jours, 5 mg de SU lui a donc été incorporé. De la même manière, la dose de PTX nécessaire à l'obtention d'un effet antitumoral suite à son relargage par le polymère est de 50 mg. Si cette dose avait été administrée par voie I.V., les animaux n'auraient pas survécu<sup>245</sup>. Nous avons donc ajouté un groupe recevant 15 mg de PTX-P.

### 5.1. Evaluation de l'efficacité sur la croissance tumorale

L'effet de la thérapie délivrée par hydrogel a été évalué sur 6 groupes de 7 rats. Les tumeurs ont été induites par injection de  $10^4$  cellules Walker 256 selon le protocole décrit en Fiche Technique n°5. Les traitements ont été administrés dès la détection de la tumeur par palpation (J5). Le premier groupe était composé de rats ne recevant aucun traitement, le second recevant le polymère seul (Drug Free-P), le troisième recevant la dose de PTX délivrée par le polymère correspondant à la dose IV (15 mg PTX-P), le quatrième recevant la dose active de PTX délivrée par le polymère (50 mg PTX-P), le cinquième recevant le SU délivré par le polymère (SU-P) et enfin le sixième recevant la combinaison de traitements délivrée par polymère (PTX-SU-P).

La croissance tumorale du groupe traité par le polymère seul (Drug Free-P) a été similaire à celle du groupe témoin (Figure 56 et Table 15). La moyenne des temps de doublement pour ces 2 groupes était de 1.8 jours. La vitesse de croissance tumorale a donc été très rapide puisque les volumes tumoraux moyens ont atteint  $16 \text{ cm}^3$  au bout de 12 jours et les rats ont été euthanasiés. Le polymère seul n'a eu aucun effet sur la croissance tumorale.



**Figure 56 : Croissance tumorale après traitements par le Paclitaxel et/ou le Sutent® relargués par hydrogels.** Les rates âgées de 8 semaines ont reçu  $10^4$  cellules Walker 256. Les traitements ont commencé dès la détection de la tumeur (5<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jours post-greffe), les animaux ont reçu une injection de 250  $\mu$ L de principes actifs incorporés dans le MedinGel™.

Groupes	Survie (jours)	Temps de doublement moyen (jours)	Volume tumoral moyen à J12 ( $\text{cm}^3$ )	Volume tumoral moyen à J18 ( $\text{cm}^3$ )
Pas de traitement	12	1.8	16	Rats euthanasiés
Polymère seul (P)	12	1.8	16	Rats euthanasiés
15 mg-PTX-P	13	2.1	9	Rats euthanasiés
50 mg PTX-P	18	2.8	5.3	14.6
SU-P	18	3	2	9
PTX 50-SU-P	18	3.5	2	6.3

] \*\*  
 ] \*  
 ] \*\*\*

**Table 15: Récapitulatif des données de l'effet des traitements incorporés en polymère.** Les statistiques ont été réalisées d'après le test de Student (\* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Pour les animaux traités avec 15 mg de PTX-P, la vitesse de croissance tumorale des animaux a été réduite par rapport aux témoins avec un temps moyen de doublement de 2.1 jours (Table 15). Cette augmentation du temps de doublement a permis de prolonger la survie des

animaux traités avec 15 mg de PTX-P de 15% (24 heures) par rapport aux témoins n'ayant reçu aucun traitement ou à ceux ayant reçu le polymère.

Pour les animaux traités avec 50 mg de PTX-P, la vitesse de croissance tumorale des animaux a été réduite par rapport aux témoins et aux animaux traités avec 15 mg PTX-P, avec un temps moyen de doublement de 2,8 jours (Figure 56). Cette augmentation du temps de doublement tumoral a permis de prolonger la survie des animaux traités avec 50 mg PTX-P de 150% par rapport aux témoins et 130% par rapport aux animaux traités avec 15 mg PTX-P (18 vs. 12 et 13 jours post-greffe). Ainsi, le volume tumoral moyen 18 jours après la greffe était de 14.6 cm<sup>3</sup>.

Pour les animaux qui ont reçu le SU-P, la vitesse de croissance tumorale a été réduite par rapport aux animaux témoins avec un temps moyen de doublement de 3 jours. Cette augmentation du temps de doublement de la tumeur a permis de prolonger la survie des animaux traités avec SU-P de 150% par rapport aux témoins. De plus, le volume tumoral moyen était de 9 cm<sup>3</sup> le 18<sup>ème</sup> jour après la greffe, soit une diminution de volume de 40% par rapport aux animaux traités avec 50 mg PTX-P.

Enfin pour le groupe d'animaux traités avec la combinaison de traitement, nous avons obtenu le meilleur effet thérapeutique. La vitesse de croissance tumorale a été réduite par rapport à tous les autres groupes, avec un temps de doublement de 3.5 jours. Ainsi le temps de doublement a été augmenté de 200% par rapport au groupe témoin ; de 125% par rapport au groupe 50 mg-PTX-P, de 116% par rapport au groupe SU-P . Cette augmentation du temps de doublement a entraîné l'augmentation de la survie des animaux de 150% par rapport aux témoins. Le volume tumoral moyen au 18<sup>ème</sup> jour était de 6.3 cm<sup>3</sup>, ainsi il a été réduit de 60% par rapport au groupe PTX-P, et de 30% par rapport au groupe SU-P, et ceci de manière statistiquement significative. (p<0.001 pour 50mg-PTX-P et p<0.01 pour SU-P).

Les différences macroscopiques avec le groupe non traité ont pu être observées dès le 7 jours (2<sup>ème</sup> jour de traitement). Entre les groupes d'animaux traités par le SU et le PTX incorporés dans le MedinGel™ (5 mg SU-P et 50 mg PTX-P), des différences ont pu être observées aux alentours du 12<sup>ème</sup> jour post-greffe. Elles se sont traduites, non seulement par la taille des tumeurs avec dans l'ordre décroissant: témoins > 50 mg-PTX-P > SU-P > SU-PTX-P (Figure 57), mais aussi par la couleur et l'aspect de la tumeur représentatif de leur vascularisation. Les tumeurs des animaux témoins étaient d'aspect très rouge, ce qui a pu

traduire une vascularisation plus importante que pour les tumeurs des animaux PTX-SU-P d'aspect blanchâtre (Figure 57).

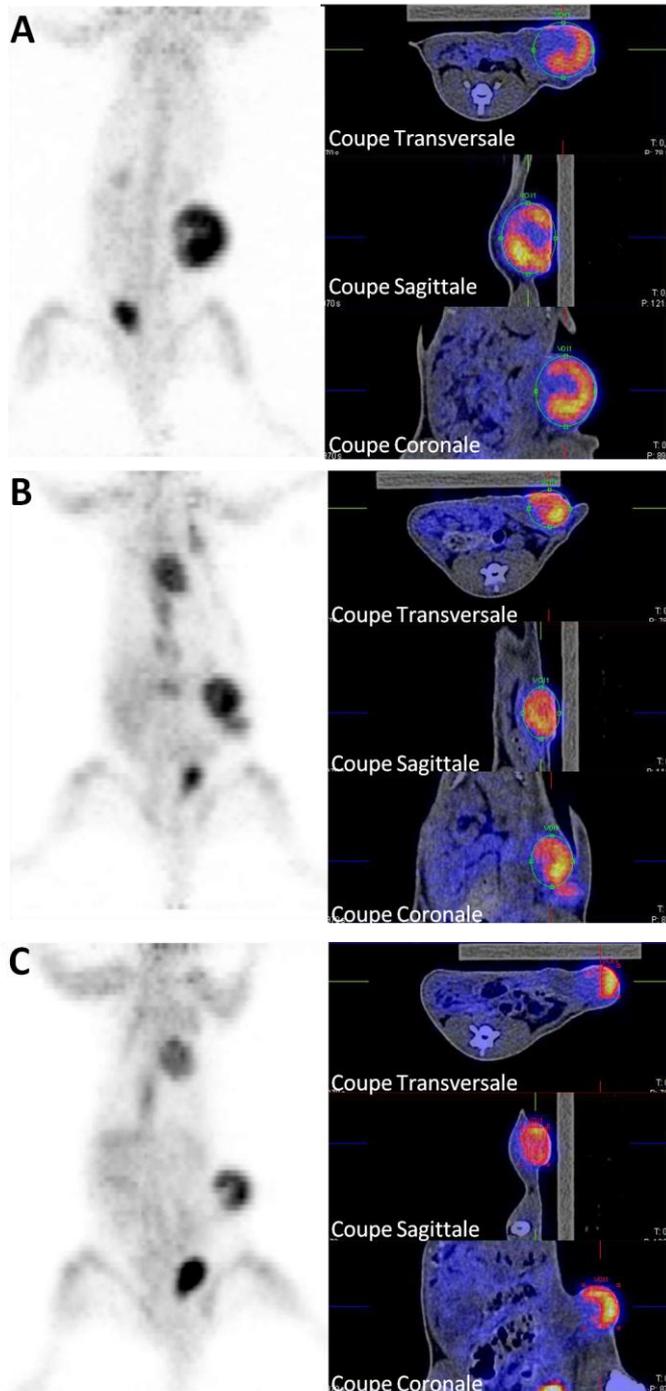


**Figure 57 : Observation macroscopique des tumeurs provenant des groupes traités avec les chimiothérapies piégées dans le MedinGel™.** Les groupes ont été traités avec les doses suivantes, SU-P : 5 mg de SU, PTX-P : 50 mg de PTX et PTX-SU-P : 50mg de PTX + 5 mg de SU.

Si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus avec le mode d'administration classique (Figure 53 et Table 14), nous pouvons dire que pour les animaux traités avec le SU *per os* (SU-po), l'effet antitumoral a été inférieur à celui obtenu lors du traitement par le SU-P. En effet, la taille des tumeurs des animaux en point final était réduite de 15% pour les animaux traités par SU-P par rapport à ceux traités par SU *per os*. De la même manière, pour les animaux traités avec la combinaison de thérapies, le volume tumoral moyen en point final était aussi réduit de 15% lorsque les molécules ont été administrées par l'hydrogel (PTX-SU-P) par rapport à la voie systémique classique (PTX-iv ; SU-po).

## 5.2. Evaluation de l'efficacité par imagerie médicale des animaux par la technique du PET SCAN

Le PET SCAN (Fiche Technique N°17) est une technique d'imagerie quantitative qui permet la détection des tumeurs, le suivi des animaux au cours de la chimiothérapie et la visualisation précoce des métastases<sup>189</sup>.



**Figure 58 : Exploration des rates par imagerie médicale, 4 jours après le début du traitement.** Rates traitées avec le PTX-P (A), le SU-P (B) et le PTX-SU-P (C). Une fois les tumeurs détectées, les animaux ont reçu une première injection de traitement incorporé en MedinGel™ en périphérie de la tumeur. Pour chaque condition, deux types d'images sont présentées. Les images en noir et blanc correspondent aux "MIP" (Maximum Intensity Projections). Les "MIPs" correspondent à la superposition de toutes les coupes d'images enregistrées au cours de l'acquisition de la tomographie par émission de positrons. La seconde série d'images correspond à des coupes de 2 mm issues de la fusion des images de scanner classique et de la tomographie par émission de positrons.

Le PET-Scan nous a permis d'obtenir différentes données quantitatives (taille, pourcentage de nécrose) (Table 16) sur les tumeurs ainsi que l'éventuelle présence de métastase. Quels que soient les groupes, aucune métastase n'a été détectable avant le 12<sup>ème</sup> jour post-greffe (7<sup>ème</sup> jour de traitement) (Figure 58).

Au 10<sup>ème</sup> jour post-greffe, les animaux traités par le PTX-P présentaient un volume tumoral de 3,98 cm<sup>3</sup> et un volume métabolique de 2,25 cm<sup>3</sup>. Ces volumes nous ont permis de calculer la proportion de tumeur nécrosée par rapport au volume total, qui représentait 44% pour ce groupe PTX-P. Pour les animaux traités par le SU-P, le volume tumoral moyen au 10<sup>ème</sup> jour post-greffe a été de 1,35 cm<sup>3</sup> et le volume métabolique de 1,04 cm<sup>3</sup>. Ainsi, le pourcentage de nécrose des tumeurs des animaux du groupe traités par le SU-P était de 23%. Enfin, pour les animaux traités par la combinaison PTX-SU-P, le pourcentage de nécrose des tumeurs était de 62%, le plus élevé des différents groupes. Les volumes tumoraux et métaboliques étaient de 1,27 cm<sup>3</sup> et 0,49 cm<sup>3</sup>, les plus bas des 3 groupes de traitement.

	<b>Volume tumoral (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Volume métabolique (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Nécrose (%)</b>
<b>PTX-P</b>	3.98	2.25	44
<b>SU-P</b>	1.35	1.04	23
<b>PTX-SU-P</b>	1.27	0.49	62

**Table 16 : Valeurs qualitatives obtenues après les PET-Scans des animaux**

### 5.3. Evaluation de la dissémination métastatique

Au terme de l'expérimentation (18<sup>ème</sup>), tous les animaux euthanasiés ont été disséqués afin de rechercher d'éventuelles métastases (Fiche Technique N°7). Les organes les plus attentivement examinés ont été les poumons, le foie, les reins, le système digestif et ganglionnaire. Les résultats sont présentés dans le Tableau suivant (Table 17).

Traitements	Nombre d'animaux ayant développé des métastases /Nombre d'animaux par groupe	% d'animaux ayant développé des métastases
PTX-P (50 mg)	6/6	100%
SU-P	5/7	85%
PTX-SU-P	3/7	43%

**Table 17 : Dissémination métastatique en fonction des traitements.**

Pour les animaux ayant survécu moins de 12 jours post-greffe (Témoins, Drug-Free-P et 15 mg-PTX-P), aucune métastase n'a été retrouvée. Néanmoins, des métastases ont été retrouvées dans tous les autres groupes traités. Ainsi, 100% des animaux ayant été traités avec 50 mg de PTX-P ont développé des métastases (Table 17). Pour les animaux traités par le SU-P, 85% des animaux ont développé des métastases. Enfin, la combinaison a permis de réduire l'occurrence des métastases puisque seulement 43% en ont développé. Cependant ces chiffres sont donnés de façon indicative car les faibles nombres de rats par groupe ne donnent pas de chiffres statistiquement significatifs (probable manque de puissance).

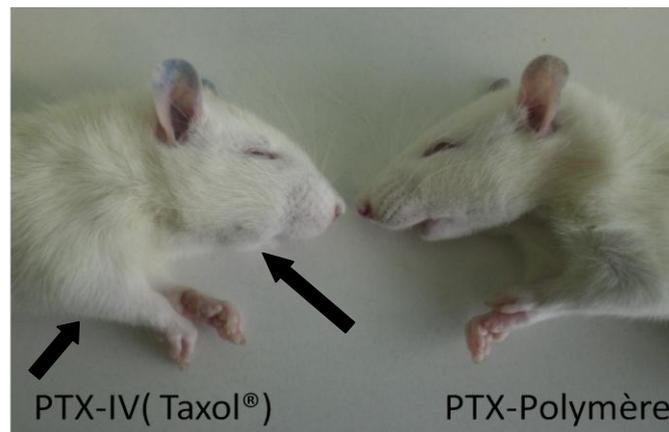
### 5.4. Effets indésirables des chimiothérapies

La grande agressivité des tumeurs a été responsable de complications chez les rats traités, tels que l'affaiblissement et la perte de poids. Le manipulateur a dû être particulièrement vigilant et adapter la nourriture donnée aux animaux, par l'utilisation d'aliments plus riches, préalablement humidifiés pour faciliter la prise de nourriture par l'animal affaibli.

Cependant, les chimiothérapies ont aussi un effet délétère sur l'état de santé des animaux. Sur toute la durée du traitement avec le Taxol®, les rats perdent environ 1,5 fois plus de poids que les animaux traités avec le PTX-P qu'il soit chargé avec 15 ou 50 mg. De plus, après

plusieurs injections de Taxol<sup>®</sup>, certains animaux ont souffert de paralysie et d'œdèmes (Figure 59). Dans certains cas, ces complications nous ont contraint à procéder à l'euthanasie prématurée des animaux. Une part de ces effets secondaires peut être attribuée au Cremophor<sup>®</sup>, l'excipient principal de la formulation du Taxol<sup>®</sup>( Cf Partie « Etat actuel du problème I.2.1.2.2.2. Le Crémophor Ethanol »)

Les polymères PTX-P, SU-P et PTX-SU-P ont une certaine toxicité (perte de poids) mais celle-ci semble être due aux molécules anticancéreuses qu'ils libèrent.

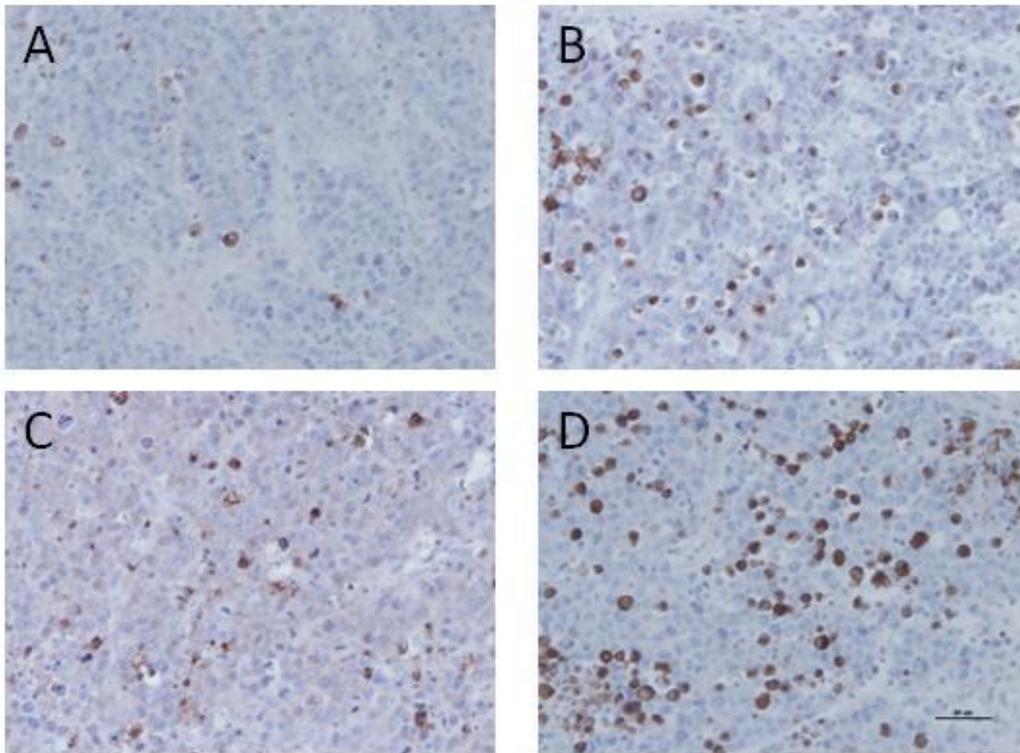


**Figure 59 : Rat traité avec du Taxol<sup>®</sup> vs rat traité avec du Paclitaxel incorporé en hydrogel (PTX-P).** Après 6 jours de traitement, sur le rat traité au Taxol<sup>®</sup> des œdèmes sont repérés par des flèches, et comparé au rat traité avec le polymère.

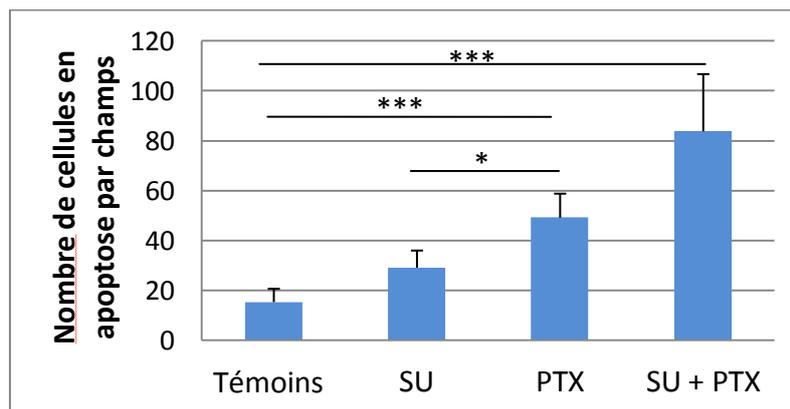
## 6. Effets histologiques de la combinaison PTX + SU délivrée par hydrogel

### 6.1. Effets sur l'apoptose cellulaire

L'effet du traitement sur l'apoptose cellulaire a été évalué en comptant le nombre de cellules marquées par un anticorps anti-caspase 3 sur une surface de coupe histologique de  $100 \mu\text{m}^2$  (Fiche Technique N°8 et 9). Pour les rats témoins, on retrouve en moyenne  $15 \pm 5$  cellules en apoptose (Figure 60-A et 61). Pour les rats traités par le SU-P et le PTX-P, le nombre de cellules en apoptose est 2 à 3 fois plus important ; respectivement  $29 \pm 7$  et  $49 \pm 10$  cellules apoptotiques dans  $100 \mu\text{m}^2$  (Figure 60 B-C). La combinaison (PTX-SU-P) permet une meilleure efficacité antitumorale puisqu'elle augmente le nombre de cellules tumorales entrant en apoptose (Figure 60-D et 61).



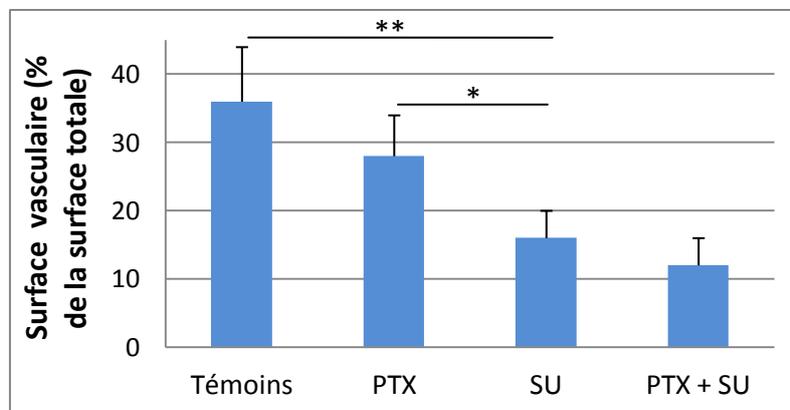
**Figure 60 : Effet des différents traitements sur l'apoptose cellulaire.** Coupes de tumeurs fixées au formol pendant 15 jours, puis marquées par l'anticorps anti-caspase 3 (1/1500<sup>ème</sup>) révélé à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'HRP (Horseradish Peroxidase) (1/1000<sup>ème</sup>). Les images ont été prises sur le LEICA DMIRB, au grossissement x100. Les photographies représentent des coupes de tumeurs issues d'un rat témoin (A), d'un rat traité au PTX-P (B), d'un rat traité au SU-P (C) et enfin d'un rat traité avec la combinaison de traitement (PTX-SU-P) (D). Voir Fiches Techniques n°8 et n°9.



**Figure 61 : Apoptose cellulaire en fonction des différents traitements en hydrogel.** Calculs réalisés à partir des coupes histologiques des tumeurs (Cf. Fiche technique n°8) à l'aide du logiciel NIS-AR (NIKON) par 2 expérimentateurs différents. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student (\* =  $p < 0.05$  ; \*\* =  $p < 0.01$  et \*\*\* =  $p < 0.001$ ).

## 6.2. Effet sur la vascularisation

L'effet sur la vascularisation des différents traitements incorporés dans le MedinGel™ (PTX, SU et PTX + SU) a été évalué grâce à un immunomarquage des vaisseaux intra-tumoraux (Fiches n°8 et n°9). Un anticorps anti-CD31, puis un anticorps secondaire couplé à la HRP ont été utilisés sur chaque coupe histologique. Le CD31 est un marqueur membranaire des cellules endothéliales. Pour l'interprétation, l'aire représentée par les vaisseaux sur chaque champ de 10  $\mu\text{m}^2$  a été évaluée. Tous les principes actifs ont réduit l'angiogénèse tumorale. Le PTX a entraîné une réduction de la densité de la vascularisation intra-tumorale de 25% par rapport au témoin, le SU de 57% et la combinaison de 71% (Figure 62).



**Figure 62 : Densité vasculaire des tumeurs des différents groupes.** Calculs réalisés à partir des coupes histologiques des tumeurs (Cf. Fiche technique n°8) à l'aide du logiciel NIS-AR (NIKON) par 2 expérimentateurs différents. Les statistiques ont été réalisées à l'aide du test t de Student (\* =  $p < 0.05$  ; \*\* =  $p < 0.01$ ).

## 7. Discussion générale de la combinaison entre le PTX et le SU *in vivo*

Dans un premier temps, nous avons démontré l'efficacité des molécules (PTX et/ou SU) sur le modèle Walker 256 suite à leurs administrations par voie systémique. Le SU, et dans une moindre mesure, le PTX ont permis d'augmenter le temps de doublement des tumeurs (2.8 vs. 2.4 jours) et de prolonger la durée de vie des animaux (144 heures vs. 48 heures). Le SU a été la molécule utilisée seule la plus active sur la tumeur Walker 256, démontrant le côté angiogénique-dépendant de ces tumeurs. En effet, comme nous l'avons étudié dans le projet n°1, du fait de leur croissance rapide, les tumeurs issues du modèle Walker 256 sont très vascularisées. Enfin, la combinaison a permis un meilleur contrôle de la progression tumorale. Ce type de combinaison entre un agent anti angiogénique et une chimiothérapie

conventionnelle a déjà été évalué<sup>247-249</sup> sur le cancer du sein. En particulier l'association entre l'Avastin®/Bevacizumab et le PTX<sup>91</sup>. Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé, dirigé contre le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Cet anticorps spécifique a été la première thérapie anti-angiogénique ayant obtenu une indication anti-tumorale (2006). En neutralisant le VEGF, il inhibe l'activation des récepteurs au VEGF et l'effet pro-angiogénique qui en découle. Après le développement de l'Avastin®, une nouvelle classe d'agent anti-angiogénique avec un spectre d'action plus large à vu le jour. Il s'agit des molécules inhibitrices des récepteurs à activité tyrosine kinase. Certaines de ces molécules (sunitinib, sorafenib, axitinib) sont déjà utilisées dans le cadre de la thérapie anti-tumorale. Leur action anti-angiogénique est induite principalement par l'inhibition du VEGFR, mais leur action est multiple. Le sunitinib (SU) possède aussi une action inhibitrice sur le PDGFR, le FGFR<sup>118</sup>. Etant donné que ces molécules possèdent un spectre d'action plus large que les anticorps monoclonaux, nous avons utilisé le SU et associé au PTX.

La combinaison entre le SU et le PTX délivrée par l'hydrogel a permis une inhibition supérieure de 15% par rapport à la combinaison délivrée de manière systémique. Cette combinaison a induit l'inhibition de la croissance tumorale, l'inhibition de l'angiogénèse tumorale et l'apoptose tumorale. De plus, l'incorporation du PTX dans l'hydrogel a permis de réduire les effets secondaires liés au Crémophor Ethanol (CrEI). En effet, la forme galénique Taxol® injectable par voie intraveineuse nécessite le mélange du PTX avec du crémophor et de l'éthanol (50/50, v/v). Cependant, le CrEI est responsable d'effets secondaires notables. Il est considéré comme étant la cause de réactions d'hypersensibilité remarquées durant des thérapies au PTX. C'est pourquoi un traitement au Taxol® chez l'homme nécessite un prétraitement à base d'antihistaminiques et de corticoïdes. Malgré ces prémédications, 40% des patients ont des réactions d'hypersensibilités mineures (rash cutanés...) et 3% des réactions plus graves, pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique<sup>85</sup>. Le CrEI induit aussi une néphrotoxicité, une neurotoxicité, ainsi que des effets sur les muscles vasculaires entraînant une vasodilatation responsable de difficultés respiratoires, de léthargies et d'hypotension. Contrairement aux rats traités avec le Taxol®, les rats traités avec le PTX-Polymère n'ont développé ni œdème, ni paralysie. La libération locale sans Crémophor® a donc permis de réduire les effets secondaires, mais aussi d'augmenter l'effet antitumoral global. Il sera intéressant d'évaluer les concentrations circulantes des molécules par le biais de prises de

sang à intervalles réguliers, et les concentrations locales à l'aide de la technique de microdialyse pour voir si nous sommes dans ce cas de figure.

Néanmoins, notre modèle étant très agressif, nous avons dû utiliser de très fortes doses de PTX pour obtenir un contrôle de la croissance tumorale. Le polymère utilisé (P6R1) a été choisi pour sa capacité à relarguer les molécules assez rapidement, mais ce n'est pas représentatif des plus gros besoins en santé animale, ni humaine. L'idéal serait de tester notre combinaison sur un modèle moins agressif en utilisant un polymère permettant l'obtention d'un relargage sur plusieurs semaines.

Afin de procéder à une évaluation complète de notre système, nous avons poursuivi l'étude par de la pharmacocinétique *in vivo* en déterminant les quantités d'actifs ayant atteint la circulation sanguine (Projet n°5) et en déterminant quel a été l'impact de notre système de relargage sur les tissus sains autour du site d'injection (Projet n°6).

## PROJET N°5 : PHARMACOCINETIQUE *IN VIVO*

---

### **Problématique :**

La cinétique du polymère *in vitro* a été caractérisée, mais qu'en est-il du comportement du polymère et des drogues *in vivo* ? Les drogues restent-elles uniquement au niveau local ou atteignent-elle la circulation sanguine ?

### **Méthodes :**

- Préparation du polymère (Fiche Technique n°12)
- Cinétique de relargage *in vivo* (Fiche Technique n°18)
- Dosage du PTX par HPLC-UV (Fiche Technique n°14)
- Dosage du SU par HPLC-MS-MS (Fiche Technique n°15)

### **Résultats :**

De très faibles quantités de PTX et de SU ont atteint la circulation sanguine. La concentration locale de ces molécules est probablement élevée. Des études de microdialyses seraient à envisager.

## 1. Problématique

Nous connaissons maintenant le comportement *in vitro* du PTX et du SU incorporés au sein du MedinGel™. En effet, après une libération rapide qui permet d'obtenir la dose de charge, ces actifs sont relargués de manière continue et prolongée dans le temps (Projet n°3, PTX 10 jours et SU 20 jours). *In vivo*, ces drogues sont-elles capables de passer la barrière sanguine ou restent-elles purement localisées ?

## 2. Libération *in vivo* du Paclitaxel

Le PTX a été incorporé avec le SU au sein du polymère P6R1 à 40% puis a été injecté de manière péri-tumorale, à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de 22 Ga. Pour chaque temps de prélèvement, 3 à 4 mL de sang ont été récoltés grâce à un prélèvement réalisé de manière intracardiaque sous anesthésie, avant l'euthanasie des animaux (Fiche Technique N° 16). Après l'extraction du sérum, le PTX a été dosé par HPLC-UV (Fiche Technique n°14). Une faible quantité de PTX a été retrouvée dans tous les échantillons sanguins, mais pour la plupart en trop faible quantité pour pouvoir être quantifié de manière fiable (Table 15). Pour le PTX, un seul point de cinétique a été retrouvé à 96 heures de relargage.

Temps de prélèvement (heures)	Concentration de PTX (ng/mL)
2	ND
6	ND
24	ND
48	ND
72	ND
96	40
120	ND

**Table 18 : Relargage *in vivo* du Paclitaxel.** Dosages réalisés par la méthode d'HPLC-UV après une extraction sur mini-colonnes. La limite de détection basse de la technique HPLC est 25 ng/mL. Pour les entrées « ND » : un pic de détection de PTX a été retrouvé mais de trop faible intensité pour pouvoir être quantifié.

### 3. Libération *in vivo* du Sutent®

Le SU a été incorporé avec le PTX au sein du polymère P6R1 à 40%, puis a été injecté de manière péri-tumorale. Pour chaque temps de prélèvement, 3 à 4 mL de sang ont été récoltés grâce à un prélèvement réalisé de manière intracardiaque sous anesthésie (Fiche Technique N° 16), avant l'euthanasie des animaux. Un pic de SU circulant ( $\approx 200$  ng/mL) a été obtenu à 2 heures et à 6 heures après l'injection du polymère, ce qui correspond à la dose de charge (Table 16). Puis la concentration a diminué fortement au cours du temps, pour redevenir quasiment à 0 en 120 heures.

Temps de prélèvement (h)	Concentration plasmatique de SU (ng/mL)
2	207
6	208
24	22
48	11
72	9
96	3
120	1

**Table 19 : Relargage *in vivo* du Sutent®.** Dosages réalisés par la méthode d'HPLC-MS après une extraction sur mini-colonnes.

### 4. Discussion

Pour le PTX, sur les deux échantillons prélevés à 96 h, le principe actif a été détecté dans un seul un prélèvement sur les deux. Nous avons conclu que ce prélèvement était artéfactuel et qu'une très faible proportion de PTX est retrouvée dans le sang. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors du relargage de l'OncoGel™<sup>143</sup>, qui est un hydrogel à base de PLGA et de PEG chargé en PTX et injecté de manière péri-tumorale (Cf. Partie II.2.3. OncoGel™), pour lequel moins de 0.1% du PTX chargé est retrouvé dans la circulation<sup>143</sup>, la majeure partie du PTX restant est localisée au niveau de la tumeur. Ceci est aussi confirmé par le fait que les rats recevant 50 mg de PTX par hydrogel ne développent pas d'œdèmes ni de paralysie

contrairement à ceux recevant 15 mg de Taxol® (PTX+CrEI) par voie intraveineuse. De plus, une partie du PTX a aussi pu être captée par l'œdème inflammatoire généré par l'injection du SU-PTX-P.

Pour le SU, il n'existe à notre connaissance aucun travail réalisé sur sa libération via un hydrogel. Lorsque le SU est libéré via P6R1, une dose importante de SU se retrouve dans la circulation sanguine 2 et 6 heures après l'injection. La libération se prolonge dans le temps mais à des concentrations bien moins élevées, ces dernières sont inférieures aux concentrations circulantes minimales habituellement retenues pour obtenir un effet anti-tumoral ( $\approx 200 \text{ ng/mL}$ )<sup>250,251</sup>. Son relargage a été beaucoup plus rapide qu'*in vitro*, la pression générée par les frottements liés aux mouvements de l'animal sur le polymère a pu contribuer à faciliter sa sortie. Enfin, contrairement aux données du PTX suite à sa libération via l'Oncogel™, le SU a dû passer plus facilement la barrière sanguine. Cela peut être en partie attribué à sa plus faible hydrophobicité et à sa plus petite taille.

# PROJET N°6 : TOXICITE CUTANEE DU POLYMERE

---

## **Problématique :**

L'efficacité du MedinGel™ pour le relargage local du PTX et SU a été démontrée au cours des précédentes étapes de ce travail (Projet n°5). Mais qu'en est-il de l'impact du polymère sur les tissus sains ? Aussi avons nous cherché à évaluer l'effet du polymère sur les tissus sains à travers la profondeur de la lésion, le type de tissus touché, l'intensité de l'inflammation induite, et la potentielle nécrose.

## **Méthodes :**

- Préparation du polymère (Fiche Technique n°12)
- Euthanasie et autopsie des animaux (Fiche Technique n°7)
- Réalisation de coupes histologiques (Fiche Technique n°8)
- Marquage de coupes histologiques (Fiche Technique n°9)
- Test de toxicité cutanée du MedinGel™ (Fiche Technique n°18)
- 

## **Résultats :**

Le MedinGel™ injecté sans actif est responsable d'une réaction inflammatoire modérée qui cicatrise en 14 jours environ. Le MedinGel™ combiné aux molécules de chimiothérapie (SU + PTX) entraîne une forte réaction inflammatoire et induit une lésion nécrotique au niveau du site d'injection.

## 1. Problématique

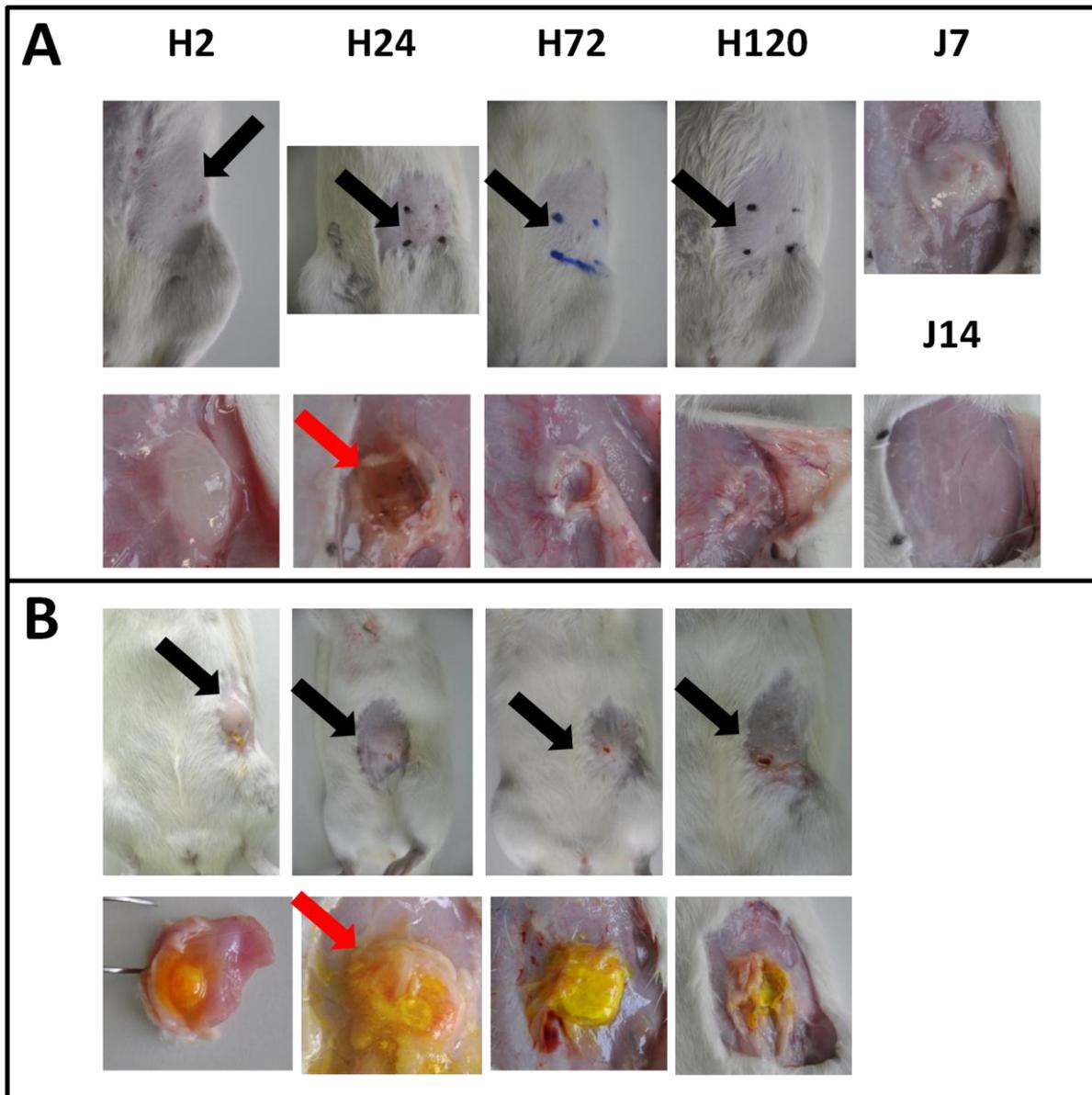
Le MedinGel™ est un copolymère composé de PLA, de PEG et de DMSO. Ces trois molécules sont utilisées dans les pharmacopées européenne et américaine. Cependant, nous devons nous assurer que l'implantation du polymère n'entraînait pas de lésion trop importante des tissus sains. En effet, les différents traitements Drug Free-P et PTX-SU-P ont été administrés sur le même site de l'injection péri-tumorale dans une zone saine. Nous avons alors étudié l'influence du polymère seul et associé au SU et au PTX.

## 2. Toxicité cutanée du MedinGel™ seul et associé au Paclitaxel et Sutent®

L'injection du polymère en sous cutané a entraîné une réaction inflammatoire au niveau de la zone d'injection. Les prélèvements ont été réalisés 2, 6, 24, 48, 72, 96 et 120 heures après l'injection du polymère (Fiche Technique N°18). Des coupes histologiques suivies d'une coloration Hématoxiline Eosine ont été réalisées afin de rechercher des signes d'inflammation. On rappelle que l'inflammation correspond à l'ensemble des modifications tissulaires, vasculaires et humorales consécutives aux lésions des cellules et des tissus, quelque soit l'étiologie. L'inflammation se déroule dans le tissu conjonctif et a pour but de réparer les effets de l'agression. La réparation et la cicatrisation en constitue le stade ultime.

### 2.1. Evolution du site d'injection

Au réveil des animaux, aucune gêne particulière n'a été remarquée, ni démangeaisons, ni stress autre que celui de l'anesthésie, ni poils hirsutes. D'un point de vue externe, le polymère, une fois injecté, s'est apparenté à une petite protubérance arrondie et mobile à la palpation (Figure 63 A et B, flèches noires). Pour les animaux ayant reçu le polymère seul, cette protubérance n'a plus été visible dès 48 h, alors qu'elle a persisté chez les animaux ayant reçu le polymère + les chimiothérapies pendant les 120 h (5 jours) de l'étude. De plus, un début de nécrose a été visible dès 72 h chez ces animaux (Figure 63-B). Au niveau des couches sous-cutanées, nous avons remarqué un gonflement des tissus qui s'est intensifié au cours des 24 premières heures chez les deux groupes d'animaux. Cet œdème, qui s'est apparenté à de l'inflammation, a été bien plus important chez les animaux ayant reçu le polymère associé aux chimiothérapies (Figure 63, A et B flèches rouges). Il s'est entièrement résorbé chez les animaux ayant reçu le MedinGel™ seul en 14 jours (Figure 63A).



**Figure 63 : Evolution du site d'injection du polymère.** Polymère seul (A), ou en présence de PTX + SU (B). Sont représentés les sites d'injections d'un point de vue extérieur et sous-cutané. La couleur jaune est liée au SU. Les flèches noires représentent le site d'injection du polymère, les rouges l'œdème induit par le polymère.

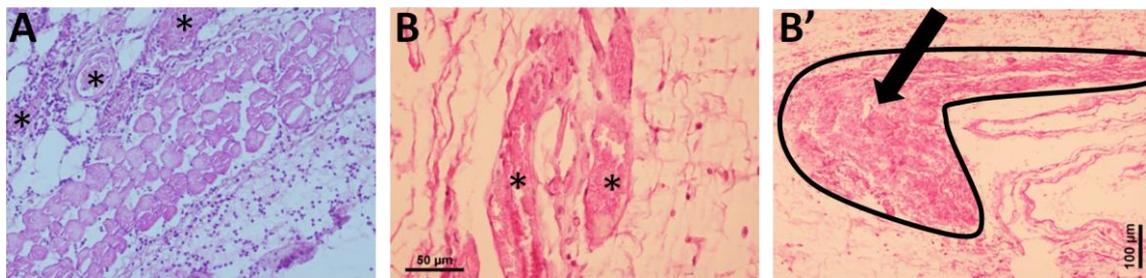
## 2.2. Phase aiguë de l'inflammation ou vasculo-exudative

Pour mémoire, on rappelle que, quel que soit son siège et la nature de l'agent induisant l'inflammation, le déroulement d'une réaction inflammatoire présente des caractères et des mécanismes communs. Les différentes étapes présentent des variations en fonction par exemple de la nature de l'agent pathogène ou du lieu de la réaction : tous ces éléments conditionnent l'intensité, la durée de la réaction inflammatoire et l'aspect lésionnel. La première phase de l'inflammation dite aiguë ou vasculo-exudative, se traduit par un œdème

inflammatoire, la congestion des vaisseaux, et une diapédèse leucocytaire, que nous avons pu observer sur nos prélèvements tissulaires.

- **Congestion des vaisseaux sanguins**

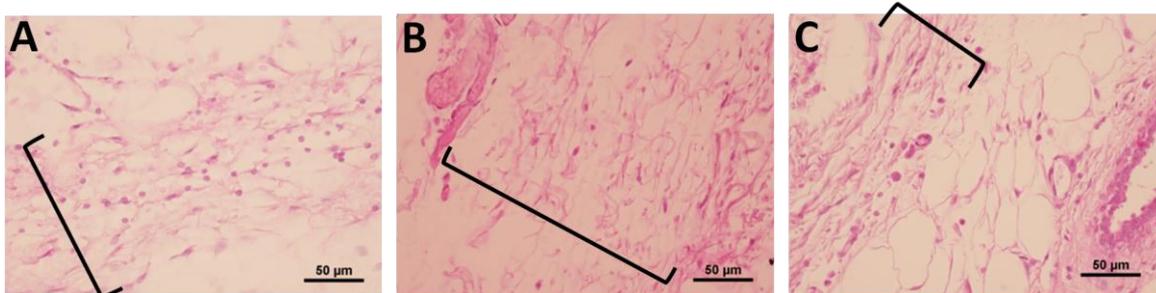
Sur les coupes histologiques de la zone d'injection du polymère, nous avons pu observer des vaisseaux dilatés et remplis d'hématies (Figure 64 A et B). Les congestions de vaisseaux sont plus nombreuses pour le site d'injection ayant reçu le polymère couplé aux chimiothérapies. De plus, pour le site d'injection du polymère contenant la combinaison de chimiothérapie des hémorragies ont pu être observées (Figure 64 B').



**Figure 64 : Congestion des vaisseaux sanguins suite à l'injection du polymère.** Les coupes ont été réalisées à partir des sites d'injections du polymère, 2 heures et 6 heures après leur injection. Nous pouvons observer la congestion des vaisseaux entraînée par l'injection du polymère seul (A) ou du polymère couplé au PTX et SU (B). En (B'), nous observons une hémorragie entraînée par la réaction inflammatoire liée à l'injection de PTX et SU. Les astérisques permettent de visualiser les vaisseaux congestionnés. La partie cerclée et ciblée par une flèche représente le site de l'hémorragie.

- **Formation d'un œdème inflammatoire**

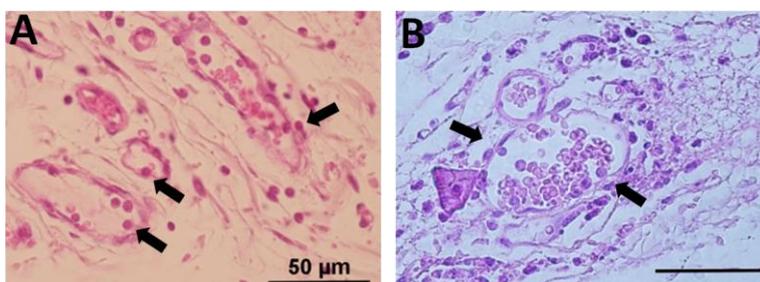
Suite à l'injection des polymères, nous avons pu remarquer un gonflement des tissus proches du site d'injection (Figure 65 A et B), en comparaison au tissu mammaire qui n'a pas reçu de polymère (Figure 65 C). Ce gonflement des tissus ou œdème est lié au passage dans le tissu conjonctif d'un liquide fait d'eau et de protéines plasmatiques. On le reconnaît en microscopie par l'aspect pâle, peu colorable et distendu qu'il donne au tissu conjonctif. Ainsi, nous avons pu observer que les animaux ayant reçu le polymère combiné au PTX + SU ont développé un œdème plus important que les animaux ayant reçu le polymère seul.



**Figure 65 : Œdème inflammatoire suite à l'injection de polymère.** Les coupes ont été réalisées à partir des sites d'injection du polymère, 2 heures et 6 heures après leur injection. Nous pouvons observer la réaction entraînée par le polymère seul (A) ou par le polymère couplé au PTX et SU (B). Ces résultats ont été comparés à (C), un tissu n'ayant reçu que du sérum physiologique. Les crochets représentent le gonflement de la partie proche de la zone d'injection.

- **Diapédèse leucocytaire**

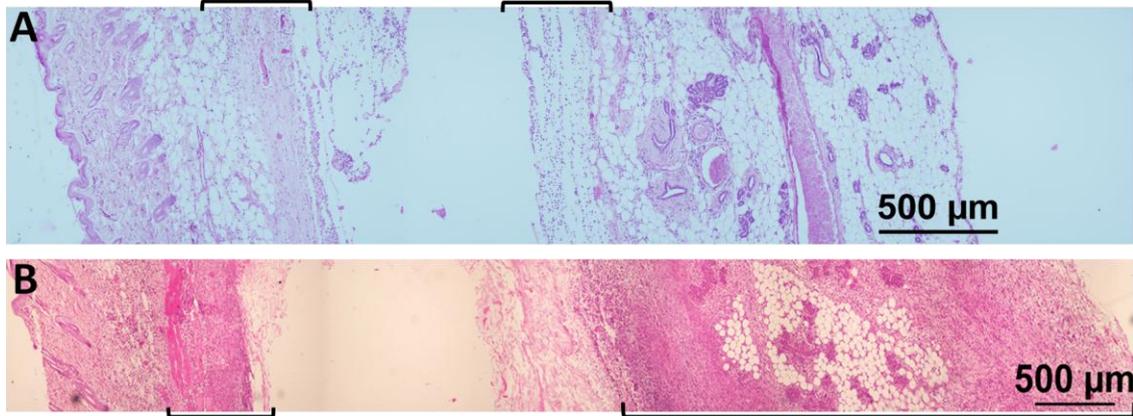
Que ce soit pour le polymère seul ou combiné aux PTX et SU, nous avons pu observer ce phénomène (Figure 66 A et B).



**Figure 66 : Diapédèse leucocytaire suite à l'injection du polymère.** Pour le MedinGel™ seul (A) et pour les chimiothérapies couplées au MedinGel™ (B). Les flèches indiquent les leucocytes qui ont adhéré aux cellules endothéliales prêts à effectuer la diapédèse.

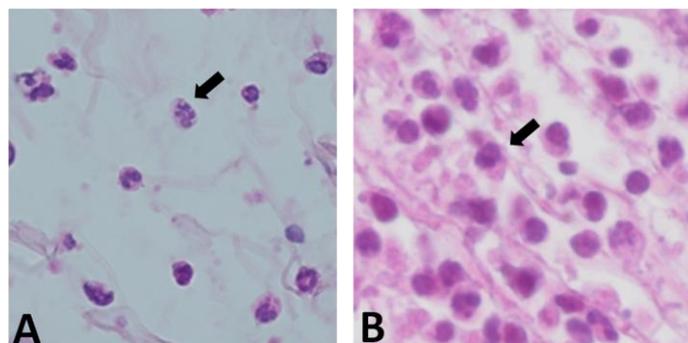
### 2.3. Phase cellulaire de l'inflammation

Nous avons pu observer des éléments de cette phase dans nos prélèvements. En effet, quand le polymère injecté était couplé avec le PTX et le SU (Figure 67), un nombre important de cellules migrait des vaisseaux (diapédèse) vers la zone d'injection induisant ainsi la formation d'un granulome inflammatoire. En revanche, cette zone était beaucoup plus faible pour le polymère seul (injecté sans chimiothérapie) comme en témoignent les images de la Figure 67.



**Figure 67 : Vue globale du site de la réaction inflammatoire 24 h après l'injection de polymère.** Les zones repérées par les crochets sont les zones autour du site d'injection du polymère. Pour le MedinGel™seul (A) et pour les chimiothérapies couplées au MedinGel™ (B)

La composition de ce granulome inflammatoire a varié en fonction du temps. Dans les premiers jours nous avons retrouvé une majorité de polynucléaires, puis ces derniers ont été remplacés par des cellules mononuclées (macrophages, lymphocytes, plasmocytes) (Figure 68). Enfin, au fur et à mesure de la cicatrisation, nous avons retrouvé au sein des sites d'injections des polymères seuls, des signes de cicatrisation à savoir des fibroblastes et des néovaisseaux. Pour les animaux ayant reçu le polymère combiné aux chimiothérapies, nous ne sommes pas allés au delà de 5 jours à cause de la nécrose induite (obligation d'euthanasie). Toutes ces dernières modifications n'ont pas été retrouvées sur le site d'injection.



**Figure 68 : Evolution des cellules immunitaires au sein du granulome.** Au cours des 6 premières heures(A), puis à 48 heures (B). Les flèches indiquent pour (A) un polynucléaire et pour (B) un leucocyte.

### 3. Discussion

Le polymère seul est responsable d'une réaction inflammatoire modérée, nous avons retrouvé des preuves de toutes les étapes de l'inflammation, de la congestion des vaisseaux à la cicatrisation des tissus. Nous pouvons supposer que le DMSO ou diméthylsulfoxyde, solvant du polymère peut être une des causes de cette réaction inflammatoire. Bien que reconnu par la pharmacopée puisqu'il a obtenu son AMM en 1978 (« for use in the treatment of interstitial cystitis, by intravesical instillation »), il est aussi capable d'engendrer une toxicité cutanée. Le MedinGel™ est soluble dans d'autres solvants tels que de l'éthyl lactate 98%, du triacétine, du diéthylglycol diméthyl éther (diglyme) et du diéthylène glycol monoéthyl éther 99% (degmee). Il serait intéressant de tester la toxicité cutanée du polymère resuspendu dans ces solvants.

En revanche, lorsque les agents de chimiothérapies sont incorporés dans le polymère une forte réaction inflammatoire est générée (Œdème, hémorragies, granulome). Cette réaction est liée à la libération des molécules actives qui induisent une lésion des tissus sains. Etant donné l'agressivité de notre modèle animal, nous avons délibérément choisi un polymère qui permettait une libération relativement rapide. Cependant, pour d'autres types de cancers, ces concentrations ne sont pas forcément nécessaires et la libération pourrait être beaucoup plus prolongée diminuant de ce fait l'intensité de la réaction inflammatoire. Un test reliant les concentrations d'actifs et la toxicité cutanée engendrée, pourrait être très informatif et permettre d'évaluer le ratio bénéfices/risques.

# PROJET N°7 : APPLICATION A D'AUTRES AGENTS ANTICANCEREUX

---

## Problématique

Le MedinGel™ peut être le support de libération locale du PTX seul et combiné au SU. Cette méthode de libération peut-elle être étendue à d'autres molécules ? Au sein du laboratoire, des travaux ont été réalisés sur des molécules anti-angiogéniques. Compte tenu des résultats obtenus avec la combinaison PTX/SU, nous avons donc évalué le potentiel de la combinaison entre le SU et le Fingolimod (FTY) dans la perspective d'une future bithérapie voir trithérapie délivrée par hydrogel.

## Méthodes

- Culture de cellules Walker 256 (Fiche Technique n°2)
- Culture de cellules primaires vasculaires (Fiche Technique n°20)
- Test de migration en agarose (Fiche Technique n°11)
- Culture cellulaire en 3 Dimensions (Fiche Technique n°19)
- Greffe de cellules Walker 256 (Fiche Technique n°5)
- Suivi des animaux (Fiche Technique n°6)
- Euthanasie et autopsie (Fiche Technique n°7)
- Réalisation de coupes histologiques (Fiche Technique n°8)
- Marquage de coupes histologiques (Fiche Technique n°9)

## Résultats

L'association des deux molécules présente une action anti-angiogénique accrue. *In vitro*, la combinaison SU/FTY diminue les capacités migratoires des cellules vasculaires ralentissant ainsi leur recrutement par les cellules tumorales ainsi que leurs capacités d'organisation tridimensionnelle. *In vivo*, cette même combinaison induit un ralentissement de la croissance tumorale supérieur à chacun des traitements seuls ainsi qu'une normalisation de la vascularisation intra-tumorale.

## 1. Problématique

Dans le Projet n°5, nous avons démontré que l'association SU/PTX délivrée par hydrogel a permis une augmentation de l'efficacité antitumorale par rapport aux molécules seules et au mode d'administration standard (per os pour le SU et IV pour le Taxol®). Nous avons aussi démontré qu'il était possible d'incorporer 2 molécules au sein du MedinGel™ et de pouvoir les libérer simultanément. Le SU, est une molécule à visée anti-angiogénique dont l'action principale est d'inhiber la migration des cellules endothéliales. Elle intervient donc aux stades précoces de l'angiogenèse tumorale. Des études suggèrent que l'inhibition à la fois des cellules endothéliales et murales (péricytes et cellules musculaires lisses (CMLs), intervenant dans les phases plus tardives) permet une meilleure inhibition de la vascularisation intra-tumorale<sup>252,253</sup>. Plusieurs facteurs de croissance jouent un rôle dans le recrutement des péricytes et CMLs, mais le PDGF et la S1P semblent prépondérants<sup>254-257</sup>. Le Fingolimod (FTY) est actuellement indiqué pour le traitement de la sclérose en plaque. Ce dernier est un analogue de la S1P susceptible de bloquer le signal passant par deux de ces récepteurs (S1P1 et S1P3) connus pour leurs rôles dans le recrutement des péricytes et CMLs par l'endothélium. Dans l'idée de combiner ces 3 molécules (PTX-SU-FTY) au sein du MedinGel™, nous avons commencé dans un premier temps par l'évaluation de l'effet de la combinaison entre le SU et le FTY. Le mode d'action prépondérant de ces dernières molécules étant l'inhibition de l'angiogenèse tumorale, les méthodes d'évaluation de l'efficacité de la combinaison qui ont été utilisées dans ce dernier projet sont différentes de celles utilisées jusqu'à présent, on retrouve des expériences *in vitro* de migration des cellules musculaires vasculaire, ainsi que des expériences de développement du réseau vasculaire en 3 dimensions dans une matrice de blanc d'œuf. Ces techniques ont permis l'évaluation, d'une part du recrutement des cellules musculaires vasculaires par les cellules tumorales, et l'influence des molécules de chimiothérapie sur cette phase importante dans la stabilisation des vaisseaux néo-formés. D'autre part, le développement du réseau vasculaire en 3-dimensions est une étape intermédiaire entre la migration cellulaire en 2D et le développement *in vivo*.

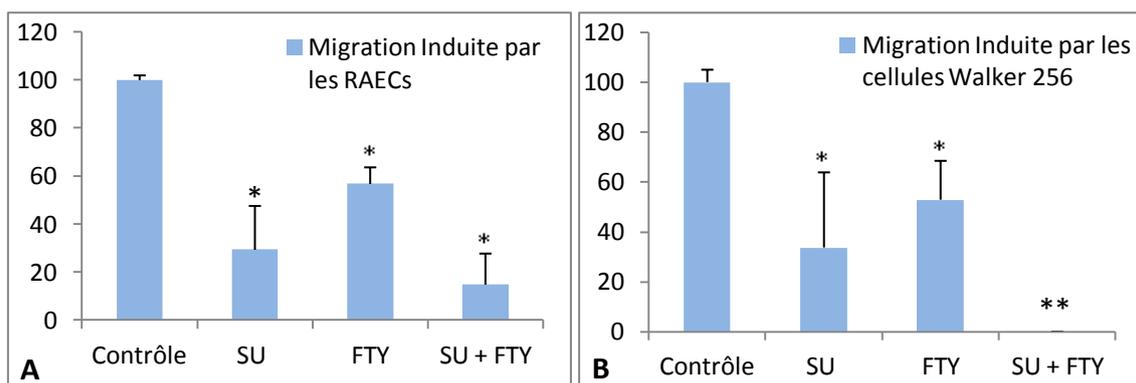
## 2. Combinaison Sutent<sup>®</sup> et Fingolimod

### 2.1. Efficacité anti-angiogénique

L'efficacité anti-angiogénique de la combinaison a été évaluée à deux niveaux, celui de la migration des cellules vasculaires à travers un test de migration cellulaire en agarose (Fiche Technique n°11), et celui de la formation du réseau pré-vasculaire grâce à un test de culture cellulaire en 3D (Fiche Technique n°19).

#### 2.1.1. Migration des cellules musculaires vasculaires

La vitesse de migration des CMLs a été évaluée après 8 jours de traitements (Fiche Technique N°11). Les cellules non traitées ont migré avec une vitesse moyenne de 400  $\mu\text{m}$  par jour qu'elles aient été stimulées par les cellules endothéliales (RAECs)(Figure 69A) ou par les cellules Walker 256 (Walker)(Figure 69B). Le traitement par le SU a diminué la migration des CMLs induites par les RAECs ou les Walker 256, de 70%. Le FTY, a permis une diminution de la migration de 43%. Enfin, la combinaison du SU et du FTY a démontré une additivité d'effets entre les deux molécules puisque l'inhibition générée est de 90% et 100% lorsque les CMLs sont soumises aux facteurs de croissance des RAECs et des Walker 256 respectivement.

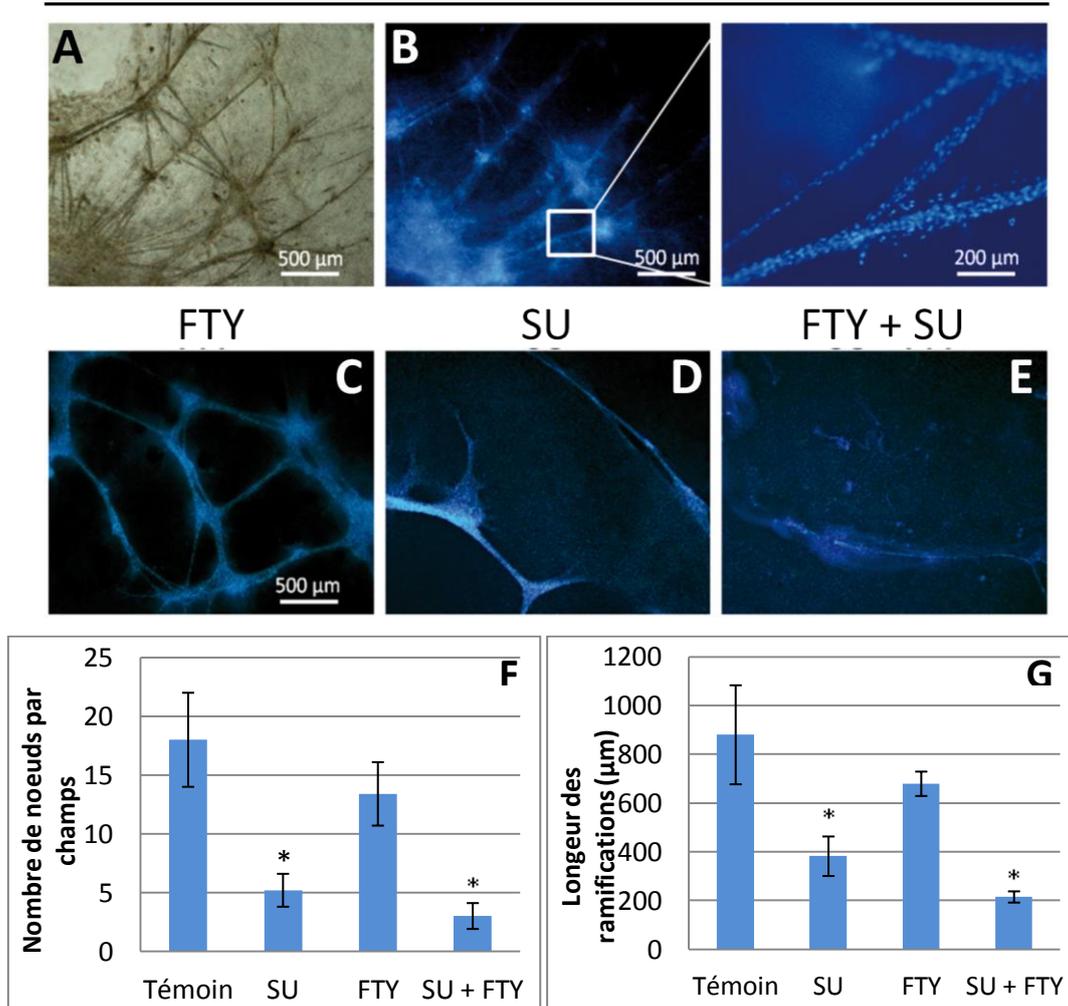


**Figure 69 : Inhibition du recrutement des CMLs par les cellules endothéliales et tumorales.** Les CMLs traitées par SU (1  $\mu\text{M}$ ) et/ou FTY (100 nM) ont été soumises aux facteurs chimio attractifs délivrés par (A) des cellules endothéliales de rat (RAECs), ou (B) des cellules de tumeurs mammaires (Walker 256). La vitesse de migration a été évaluée en point final soit 8 jours après leur incubation (\*  $p < 0.05$  vs. Cellules témoin ; \*\*  $p < 0.01$  vs. Cellules témoins).

### 2.1.2. Formation d'un réseau pré-vasculaire en 3D

Le blanc d'œuf fourni un milieu de culture en 3D comparable à celui offert par Matrigel™<sup>258</sup>. En Matrigel™, les CMLs sont capables de former un réseau similaire à celui des cellules endothéliales. Les CMLs ont formé un réseau que nous avons pu observer à la lumière visible (Figure 70 A), ou en fluorescence après coloration au DAPI (Figure 70 B, x25 et x50). Les réseaux denses qui ont été formés par les CMLs sans traitements ont montré de nombreuses ramifications interconnectées. Lorsque les cellules ont été traitées avec le FTY et/ou SU, la structure de ce réseau s'est trouvée modifiée de manière plus ou moins importante. Le FTY seul (Figure 70 C) n'a pas empêché la formation du réseau, ce dernier a été d'un point de vue structurel similaire à celui des cellules non traitées. En effet, le nombre de croisement (Figure 70 F) et la longueur des ramifications (Figure 70 G) ne sont pas statistiquement différents. En revanche, le traitement des CMLs par le SU et la combinaison FTY/SU, ont inhibé la formation des réseaux et ont empêché la formation de structure en 3D, les cellules se sont, en grande majorité, multipliées en monocouche, sans former de structures particulières. Ainsi, le nombre de croisements et la longueur des ramifications ont été difficiles à visualiser et ont été significativement moins importants que pour les cellules non traitées (Figure 70 F et G).

## Témoin



**Figure 70 : Inhibition de la croissance et de l'organisation spatiales des CMLs dans le blanc d'œuf, grâce à un marquage nucléaire avec le colorant Hoescht 33258 (100 ng/mL).** Réseau formé sans traitement en lumière visible (A) ou en fluorescence au grossissement x25 et x50 (B). Réseaux formé en présence de FTY (100 nm) (C), SU (1 µM) (D), FTY + SU (E). Les graphiques sont issus de l'exploitation des données pour chaque condition, (F) représente le nombre de nœuds par champs et (G) la longueur des ramifications (\* p<0.05 vs. Cellules témoin).

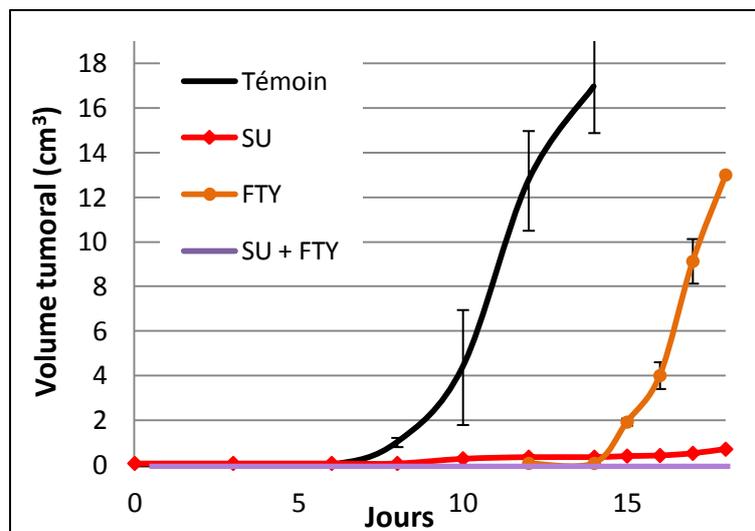
### 2.2. Efficacité anti-tumorale

Dans un premier temps, l'effet de la combinaison FTY/SU a été évalué avant que la tumeur ne soit palpable sur le modèle Walker 256, les effets étudiés peuvent s'apparenter à ceux obtenus en clinique après la résection de la tumeur afin de voir si le traitement peut diminuer les rechutes. Dans un second temps, le traitement a débuté une fois les tumeurs palpables, ce qui nous a permis d'appréhender le potentiel antitumoral de la combinaison.

### 2.2.1. Croissance tumorale

- **En traitement préventif :**

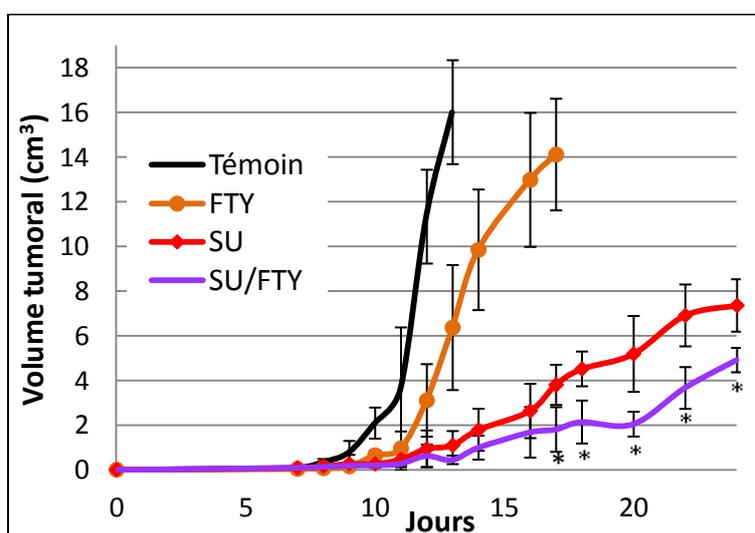
Les tumeurs des rats témoins ont été détectées 5 jours après la greffe de  $10^4$  cellules Walker 256 (Figure 71). Sans traitement, les rates ayant développé une tumeur mammaire (80%) ont dû être euthanasiées 7 jours plus tard pour raisons éthiques. Sur le groupe des rates traitées au SU, seul 20% ont développé une tumeur. La croissance tumorale a débuté en même temps que les rats témoins (jour 6) mais a été particulièrement ralentie puisque la taille moyenne des tumeurs est passée  $0,065 \text{ cm}^3$  à  $0,74 \text{ cm}^3$  sur 10 jours de traitements (Figure 71). Sur le groupe des rates traitées au FTY, 80% ont développé une tumeur, seulement le temps de latence avant la détection de la tumeur a été doublé (12 jours vs 6 pour les rates du groupe témoin). En revanche, une fois la tumeur détectée, la vitesse de croissance tumorale a été similaire à celle des rats témoins. Pour le groupe de rates ayant été traitées avec la combinaison, aucun animal n'a développé de tumeur sur les 20 jours de l'expérience.



**Figure 71 :** Effet de la combinaison Sutent® et Fingolimod en prévention du développement tumoral, *in vivo*. Les rates ont reçu  $10^4$  cellules Walker 256 au niveau de la glande mammaire inguinale gauche. Les traitements ont débuté deux jours avant que les tumeurs soient palpables (J5) et ont été administrés quotidiennement par gavage (SU : 40 mg/kg, et/ou FTY : 5 mg/kg).

- **En traitement curatif :**

Le traitement a été administré dès la détection des tumeurs. Les tumeurs des rates n'ayant pas reçu de traitement ont été détectées dès le 7<sup>ème</sup> jour post-greffe et ont dû être euthanasiées 7 jours plus tard pour raisons éthiques. Le traitement par le FTY seul a permis de réduire la vitesse de croissance tumorale puisqu'il a augmenté la durée de vie des animaux de 5 jours (Figure 72). L'effet du traitement par le SU seul, a réduit la croissance tumorale puisqu'en 25 jours la taille des tumeurs était de 7,4 cm<sup>3</sup>. De plus, la durée de vie des animaux a été prolongée de 12 jours par rapport aux témoins. La combinaison de traitement améliore l'efficacité antitumorale de 40% par rapport au traitement SU seul et ce de manière significative.

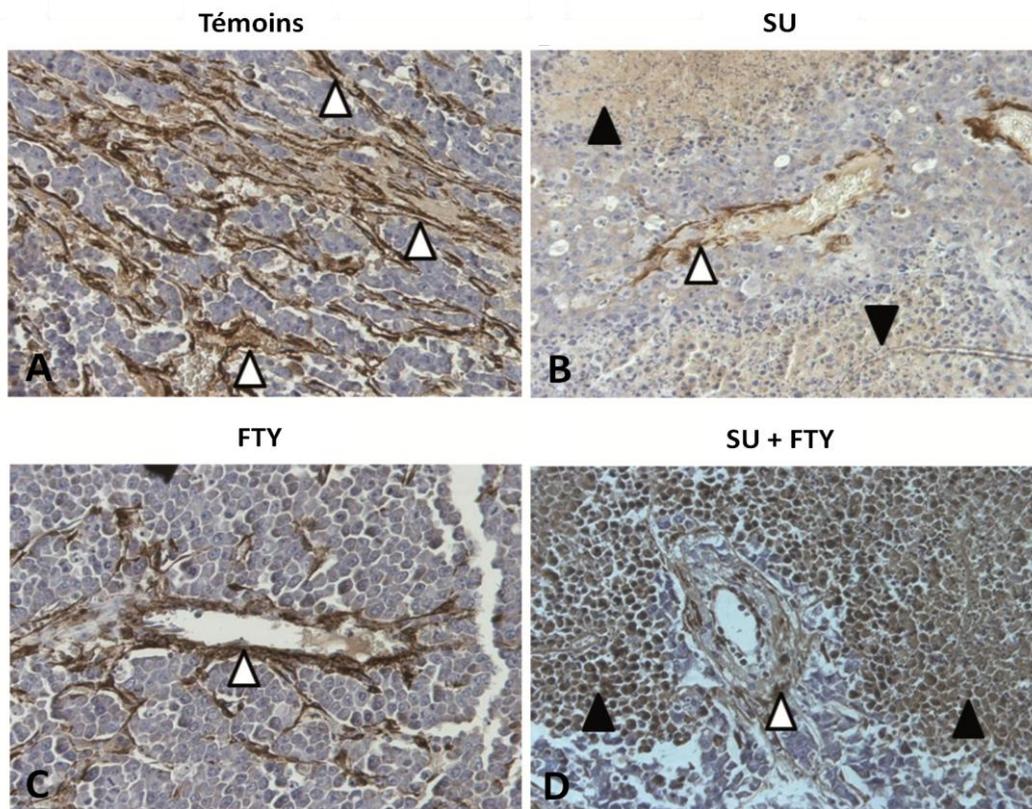


**Figure 72 : Effet de la combinaison Sutént® et Fingolimod sur le développement tumoral *in vivo*.** Les rates ont reçu 10<sup>4</sup> cellules Walker 256 au niveau de la glande mammaire inguinale gauche. Les traitements ont débuté dès que les tumeurs ont pu être palpables (J7) et ont été administrés quotidiennement par gavage (SU : 40 mg/kg, et/ou FTY : 5 mg/kg). (\* p<0.05 vs. Rats SU).

### 2.2.2. Effets histologiques de la combinaison

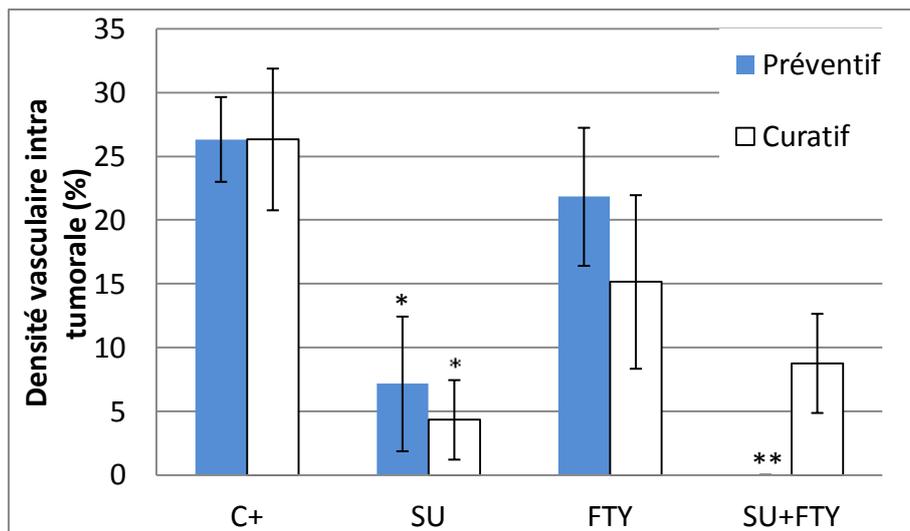
Le marquage par l' $\alpha$ -actine sur les différentes coupes de tumeurs a permis de marquer les CMLs. Le réseau vasculaire des tumeurs des rates du groupe témoins (Figure 73A) était dense et anarchique. Même si le centre de ces tumeurs était nécrotique, la périphérie hautement métabolique était très richement vascularisée (Figure 74). Les tumeurs du groupe de rates traitées par le SU avaient une croissance ralentie par rapport à celles du groupe témoin, et avaient une plage de nécrose moins importante et très peu vascularisée

(Figure 74). En effet, les vaisseaux ayant desservis ces tumeurs étaient composés d'une monocouche de cellules endothéliales et une monocouche de CMLs (Figure 73 B).



**Figure 73 : Analyse histologique des vaisseaux intra-tumoraux.** Les tumeurs des rats traités avec 40 mg/kg de SU (B), 5 mg/kg de FTY (C) et SU + FTY (D) ont été incluses en paraffine et marquées à l'aide de l' $\alpha$ -actine.

Les rates ayant été traitées au FTY, ont développé des tumeurs dont le pourcentage de nécrose était inférieur à celui des tumeurs des rats témoins mais dont la densité vasculaire était similaire (Figure 74). Cependant, la répartition des vaisseaux au sein des tumeurs était plus régulière et la structure de ces vaisseaux plus mature. En effet, les vaisseaux des tumeurs présentaient plusieurs couches de CMLs (Figure 73C). Enfin, les tumeurs issues des animaux traités avec la combinaison de molécules sont apparues aussi nécrotiques que les tumeurs du groupe témoin, mais avec une densité vasculaire comparable à celle du groupe traité au SU (Figure 74). Du point de vue structurel, les vaisseaux desservant cette tumeur étaient plus structurés que ceux des autres groupes, car ils étaient composés de plusieurs couches de CMLs (Figure 73D).



**Figure 74 : Densité vasculaire intra-tumorale (\*  $p < 0.05$  et \*\*  $p < 0,01$  vs. Tumeur de rat témoin ).**

### 3. Discussion

Le SU inhibiteur du PDGF et le FTY de la S1P1 et S1P3, ont permis de réduire la migration des CMLs voire de la bloquer lorsque les molécules ont été utilisées en combinaison. De plus, grâce au test de culture en 3D dans une matrice de blanc d'œuf, nous avons pu démontrer que le PDGF est un facteur important pour l'organisation spatiale du réseau vasculaire. La méthode du blanc d'œuf a été exposée par Kaiaparettu et al. qui la présentait comme une alternative au Matrigel™, très coûteux. Ils ont démontré à l'aide de cellules épithéliales mammaires que les structures qui s'organisaient dans le blanc d'œuf étaient similaires à celles obtenues dans le Matrigel™.

Puis, au cours de nos études *in vivo*, deux situations ont été abordées, le traitement préventif et le traitement curatif des tumeurs mammaires Walker 256. Dans les deux situations, l'association des deux molécules a montré un effet antitumoral plus important que l'utilisation des molécules seules. En traitement préventif, la combinaison a inhibé le développement tumoral pour tous les animaux greffés. En traitement curatif, la combinaison a permis de réduire la vitesse de croissance tumorale et la taille de la tumeur en point final de 40%.

Nous avons démontré que cibler à la fois l'angiogenèse précoce et tardive permettait une meilleure inhibition de l'angiogenèse et donc de la croissance tumorale. L'action du SU sur les récepteurs au VEGF permet un contrôle des phases précoces de l'angiogenèse. L'inhibition du PDGFR par le SU couplée à l'inhibition de la S1P par le FTY ont permis

d'obtenir des modifications structurelles du réseau vasculaire. Le FTY possède donc des propriétés anti-angiogéniques. Cependant, à notre connaissance, il ne lui existe pas d'autres indications thérapeutiques que celle d'immunomodulateur dans le cadre de la sclérose en plaque. Dans nos résultats *in vivo*, il potentialise l'effet du SU, ce qui confirme nos résultats obtenus *in vitro*. Le Fingolimod administré seul ou en combinaison, semble favoriser la maturation du réseau vasculaire intra-tumoral. Cette observation est d'un grand intérêt, car la normalisation du réseau vasculaire apparaît depuis quelques années comme un évènement important pour l'amélioration de l'effet antitumoral des chimiothérapies et radiothérapies<sup>259-261</sup>. Ainsi, il semble intéressant de combiner cet effet à celui d'une chimiothérapie cytotoxique telle que le PTX. Une combinaison trithérapie associant le PTX cytotoxique au SU et FTY anti-angiogénique aurait un double avantage. Le premier est lié à l'association de principes actifs en elle-même : l'association SU et FTY permettrait la normalisation du réseau vasculaire, induisant une meilleure distribution du PTX et améliorant ainsi son effet cytotoxique. Le second avantage est lié au mode de relargage local, particulièrement pour le FTY. En effet, le FTY possède une action immunomodulatrice qui pourrait, s'il se retrouve en trop grande quantité dans la circulation sanguine, induire une baisse d'efficacité du système immunitaire du patient et le rendre plus sensible aux infections. Or, comme nous l'avons exposé précédemment, le relargage local permet d'augmenter les concentrations locales d'actif tout en réduisant les concentrations circulantes, ce qui a pour but de réduire les effets indésirables ou secondaires des chimiothérapies.

# DISCUSSION GENERALE

## DISCUSSION GENERALE

---

Pour cette thèse, les objectifs fixés étaient de pouvoir formuler un agent anticancéreux le PTX, dans un hydrogel et de tester cette formulation sur un modèle animal de cancer du sein. Au cours de ces travaux, plusieurs formulations du Paclitaxel ainsi que leurs cinétiques de relargage *in vitro* ont pu être obtenues, la formulation retenue a été celle associée au polymère P6R1. Une seconde molécule a pu être combinée dans le même hydrogel, le Sunitinib malate (SU), molécule anti-angiogénique. Il a été alors possible de montrer que l'association PTX et SU possédait un effet anti-prolifératif plus important que celui des autres combinaisons testées sur la lignée cellulaire Walker 256 à la base de notre modèle animal. Enfin, la formulation en hydrogel PTX-SU-P s'est avérée plus active pour limiter la croissance des tumeurs que ces mêmes molécules administrées par voie classique, même si cette action s'accompagnait d'une certaine toxicité cutanée et tissulaire. Cependant, ces résultats sont-ils susceptibles d'être utilisables directement en clinique humaine ou vétérinaire ? Nous pensons que des améliorations par rapport aux résultats générés doivent être apportées.

### Résultats obtenus par rapport aux objectifs de cette thèse

#### Choix du modèle animal

Les caractères orthotopique et syngénique du modèle issu de la greffe de cellules Walker 256 constituent ses principales qualités. En effet, ce modèle permet d'étudier le développement des tumeurs dans un environnement tumoral comparable à la clinique humaine contrairement aux xénogreffes ectopiques. De plus, il ne requiert pas de moyens spécifiques, de simples rats immunocompétents peuvent être utilisés. D'un point de vue expérimental, la greffe des cellules Walker 256 présente un fort taux de réussite (100% de prise de greffe), et entraîne un développement reproductible et rapide des tumeurs. Néanmoins, l'agressivité de notre modèle fait que la fenêtre pendant laquelle les traitements peuvent être administrés est réduite, et les traitements appliqués doivent agir rapidement. Une lignée qui pousserait plus lentement et qui permettrait l'émergence de métastases pour les animaux témoins serait plus adaptée. Malgré ses imperfections, le

modèle Walker reste intéressant pour évaluer l'efficacité de nouvelles chimiothérapies, du fait de l'agressivité de la tumeur qui permet la production de résultats est assez rapidement. De plus, si une molécule présente un bénéfice thérapeutique sur ce modèle, son activité pour le traitement de tumeurs moins agressives, devrait être supérieure.

### **Le choix de la combinaison PTX + SU**

A l'heure actuelle, la combinaison de molécules ayant des cibles différentes semble être une voie prometteuse dans le traitement du cancer. Face à la complexité des mécanismes de défense et des multiples facteurs pathogènes, une monothérapie ou une polythérapie n'ayant qu'une seule cible semble inadaptée. Ainsi, la combinaison de molécules possédant différentes cibles thérapeutiques et ne présentant pas de toxicités cumulées peut offrir une meilleure efficacité de traitement<sup>215,217,262,263</sup>. La synergie ou l'additivité d'effets de plusieurs chimiothérapies peut en augmenter les bénéfices tout en permettant de réduire les doses. Enfin, ce type de stratégie thérapeutique semble limiter le développement de résistance<sup>168</sup>, ainsi que les effets secondaires liés au traitement.

Le développement d'une nouvelle molécule efficace en cancérologie est très long (environ 10 ans) et une faible proportion de ces nouvelles molécules parvient au terme de l'évaluation clinique<sup>264</sup>. C'est pour cela que notre choix s'est porté sur l'identification des combinaisons de traitement à partir d'anciennes chimiothérapies dont les propriétés sont déjà connues ou possèdent déjà une indication en clinique humaine. Dans notre cas, l'activité anticancéreuse cytotoxique du PTX est connue<sup>80,85,231</sup>, tout comme l'action anti-angiogénique du SU<sup>117,118</sup>, bien que ce dernier possède aussi une activité cytotoxique<sup>265</sup>. Enfin, bien qu'étant indiqué pour le traitement de la SEP (depuis 2010), l'activité anti-angiogénique et cytotoxique le FTY ont été récemment démontrées<sup>266-270</sup>.

### **Utilité de l'hydrogel pour libérer 2 chimiothérapies et intérêt du relargage local**

L'utilisation d'un système de relargage local et prolongé est un mode d'administration particulièrement attractif. L'hydrogel utilisé (le MedinGel™) a été initialement conçu dans le laboratoire du Dr M. Vert puis produit par la société MedinCell SA. Des modifications de la formulation du MedinGel™ (longueur de la chaîne de PEG et ration PLA/PEG) peuvent permettre de l'adapter aux propriétés chimiques des molécules à incorporer. Mettre au

point un hydrogel permettant le relargage simultané ou séquentiel d'une polythérapie pourrait apporter aux cancérologues un outil d'intérêt. L'usage d'un hydrogel pour libérer du PTX a déjà été initié à travers l'Oncogel™. Cependant, les études menées par la Société Diatos ont été stoppées en phase clinique. De plus, les autres systèmes de relargage local de Paclitaxel ne sont pas nombreux. Pour le SU, le relargage local n'a pas encore été réalisé à notre connaissance.

Le relargage obtenu avec le polymère présente des avantages. En effet, l'effet anti-tumoral a été amélioré d'environ 15% grâce au mode de relargage local en hydrogel par rapport à l'administration systémique et leur toxicité en a également été réduite. Bien que l'administration systémique soit le mode de délivrance le plus couramment utilisé en clinique, il entraîne des concentrations circulantes élevées de principes actifs, nécessaires pour obtenir des concentrations intra-tumorales efficaces. La contrepartie de ces fortes concentrations systémiques est l'apparition de nombreux effets secondaires indésirables : fatigue générale, perte de cheveux, atteinte intestinale, neutropénie<sup>271</sup>. De plus, pour le PTX, le développement d'une formulation dépourvue de CrEI, responsable d'effets secondaires importants, est un avantage supplémentaire. Les modes de relargage locaux sont développés pour pallier à ces problèmes<sup>272</sup>. En effet, d'après les résultats obtenus le relargage local via MedinGel™ a induit une augmentation de la concentration des principes actifs sur le site tumoral, responsable de l'amélioration de l'efficacité<sup>272</sup>, et a permis la réduction des effets secondaires<sup>273</sup> liés au Taxol® (paralysie, œdème). Pour confirmer cela, des études de microdialyse seraient nécessaires, même si leur réalisation semble difficile du fait de la lipophilie des molécules utilisées (voir ci-après).

Lors de nos travaux, bien que le polymère choisi permettait un relargage assez rapide des principes actifs et que 50% de la dose totale de PTX était libérée en moins de 24 heures, la tolérance a été meilleure que celle obtenue avec les molécules administrées par voie systémique. Cependant, pour des modèles animaux développant un cancer moins agressif, un relargage plus prolongé serait possible en utilisant d'autre polymère (P6R2.2 et P6R2.6 par exemple).

### **Injectabilité**

Le polymère testé a l'avantage de pouvoir être injectable. En effet, une aiguille de 23 Gauge est suffisante pour l'injection du dépôt au niveau de la tumeur de manière rapide ainsi en

clinique humaine, une anesthésie locale serait suffisante. Cette capacité d'injection du polymère est un atout par rapport à d'autre système de relargage local tel que le Gliadel™ pour lequel la pastille contenant le principe actif ne peut être déposée qu'après un acte chirurgical.

#### **Difficultés d'établir la corrélation des doses observées *in vitro* et *in vivo***

Lors des expériences réalisées *in vitro* avec le polymère P6R1 à 40%, une libération du PTX et du SU a été observée sur 10 jours, avec une libération initiale de 30% pour le PTX et de 45% pour le SU au cours des 24 premières heures. *In vivo*, le polymère s'est délité en 5 jours. Le relargage a été plus rapide pour le SU dont une forte concentration a été libérée en moins de 12 heures. L'hydrogel P6R1 semble se dégrader plus vite *in vivo* qu'*in vitro*.

#### **Capacité de charge en PTX et SU de l'hydrogel**

La quantité de PTX que nous avons pu incorporer dans l'hydrogel était de 200 mg/ml d'injectat (à 40% de polymère), ainsi le PTX représentait 20% du dépôt. La quantité de SU que nous avons pu incorporer au polymère était plus restreinte, du fait de sa faible solubilité en DMSO (40 mg/mL). La quantité de SU incorporé était de 30 mg/ml d'injectat (à 40% de polymère), ainsi le SU représentait 3% du dépôt. La quantité de SU intégrée dans l'hydrogel a été restreinte par la quantité de PTX, dont la dose minimale active 50 mg avait été déterminée au préalable. En réduisant la dose de PTX, il est donc envisageable d'augmenter la dose de SU.

#### **Toxicité de l'hydrogel chargé de molécules de chimiothérapies**

Le MedinGel™ est composé de PLA, biocompatible, présentant une faible hydrophilicité et de PEG hydrophile, lui aussi biocompatible et ayant la propriété d'inhiber la phagocytose des macrophages limitant ainsi la réaction inflammatoire. Injecté sans principe actif, le MedinGel™ est responsable d'une faible réaction inflammatoire qui cicatrise en 14 jours. Cette dernière est amplifiée par l'incorporation des molécules anti-tumorales. La réaction inflammatoire peut être un obstacle au bon déroulement du relargage local. Lors d'une réaction inflammatoire locale, l'œdème peut piéger les molécules de chimiothérapies, puis au cours de la cicatrisation il peut se former des réactions à corps cellulaires géants ainsi qu'une capsule fibreuse autour de l'implant/hydrogel qui l'isole des tissus environnants<sup>188</sup>.

Au cours de notre étude, ces phénomènes ont été observés. Les concentrations très élevées de principes actifs sont à l'origine de ces réactions. Pour les études suivantes, la diminution des doses de chimiothérapie, ou la réduction du burst devraient permettre de réduire cette réaction inflammatoire. Ce type de réaction doit être quantifié de manière plus précise afin de pouvoir déterminer le ratio entre le bénéfice apporté par la thérapie pour le patient/l'animal et le risque/désagrément lié à la réaction inflammatoire induite par le traitement local si elle conduit à la nécrose tissulaire.

## **Place de nos résultats face aux expériences de libération prolongée de chimiothérapies rapportées dans la Littérature**

### **Relargage local de PTX**

Le polymère que nous avons utilisé pour nos travaux était de type copolymère tri-bloc PLA-PEG-PLA. Ce type de polymère est biocompatible, biodégradable. Les autres systèmes de relargage local de Paclitaxel ne sont pas nombreux (Voir Partie bibliographique). L'Oncogel™ (ou ReGel)<sup>143</sup> est un système à base de PEG-PLGA et dont le développement a été arrêté en phase clinique IIB. En effet, l'efficacité anti-tumorale de ce traitement n'a pas été suffisante pour justifier le passage en phase III. D'un point de vue composition, ces deux systèmes de relargage local sont composés de PEG et de poly-hydroxy esters (PLA et PLGA). La famille des poly-hydroxy esters est reconnue pour sa capacité de biodégradation et sa biocompatibilité. Cependant, le PLA est plus hydrophobe que le PLGA et possède un temps de dégradation plus long, ce qui est un avantage pour formuler un système de relargage prolongé.

### **Comparaison de notre polymère-PTX aux autres formes de relargage de PTX**

En comparant notre système de relargage aux autres possibilités de relargage du PTX (Partie Bibliographique : II.1) il est possible de dégager plusieurs avantages. Tout d'abord par rapport aux formulations intraveineuses de type Abraxane®, Taxoprexine®, Xyotax®, le mode d'administration est le principal avantage du MedinGel™. En effet, toutes ces molécules restent présentes dans le sang mais seulement de quelques heures à quelques jours, contrairement au système MedinGel™ et aux systèmes de dépôt pour lequel il est possible de moduler le relargage sur plusieurs semaines. De plus, l'aspect local de l'administration permet une meilleure efficacité et une réduction de la toxicité. L'aspect local de

l'administration suite à l'injection d'un dépôt permet de mieux contrôler l'observance du patient vis-à-vis de son traitement. En effet, l'observance est un paramètre clinique important apportant des critères pour l'évaluation de la survie des patients traités.

## Perspectives pour ce travail de thèse

Le potentiel des polymères des hydrogels comme matrice de relargage pour les chimiothérapies semble bien réel. Des perspectives sont ouvertes en particulier pour associer d'autres molécules dans les hydrogels et les tester sur d'autres types de cancers, ainsi que pour développer ces combinaisons en produits utiles en médecine ou pour un usage vétérinaire.

### Amélioration du modèle animal et développement d'autres modèles

Le problème des modèles animaux, que ce soit pour le cancer du sein ou pour les autres types de cancer, est un problème récurrent<sup>208,264,274-277</sup>. En effet, la plupart des modèles animaux de cancer du sein sont trop sensibles aux chimiothérapies, ne sont pas métastasant, sont des xénogreffes et se développent chez des animaux receveurs immunodéprimés. De nombreux traitements qui arrivent en phase clinique ou préclinique sont des échecs, peut-être est-ce lié au manque de corrélation entre les modèles animaux et la clinique<sup>278,279</sup>. Conscients de ce problème, nous avons proposé des pistes de recherche dans un article de revue qui a été accepté dans le *Journal of Cancer Biology and Therapy*<sup>280</sup>.

Afin d'améliorer notre modèle Walker 256, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Premièrement, la lignée cellulaire greffée pourrait être modifiée pour réduire son agressivité en soumettant les cellules à un traitement chimique ou par radiothérapie. Toutefois, cette stratégie risque d'induire l'apparition de clones résistants encore plus agressifs. Deuxièmement, d'autres lignées de cancer du sein de rat existent telles que les lignées 64-24<sup>281</sup>, Rama<sup>281</sup>, UHKBR-01<sup>282</sup>. On peut espérer qu'une autre lignée parmi celles décrites précédemment présenterait une croissance moins rapide et se substituerait avantageusement aux Walker<sup>281-283</sup>. Enfin, des méthodes d'induction des tumeurs autres que la greffe de cellules tumorales existent. On retrouve les modèles carcino-induits<sup>277,284,285</sup> et transgéniques<sup>286-288</sup>. Cependant, ces types de modèles sont longs et délicats à développer. Ils

sont aussi moins reproductibles et particulièrement onéreux pour les modèles transgéniques.

### **Mise au point et réalisation de mesures de concentrations locales par microdialyse**

La concentration des principes actifs sur le site tumoral et le devenir de cette concentration dans le temps serait un point important à évaluer. La microdialyse permet la mesure de concentrations dans le milieu extracellulaire sans recours à une extraction tissulaire. Elle nécessite l'introduction d'une sonde munie d'une membrane semi-perméable à l'eau et aux petites molécules. Lorsque la sonde est perfusée en permanence avec une solution, elle devient l'interface entre deux milieux liquidiens : le milieu extracellulaire (ici intra-tumoral ou péri-tumoral) et le milieu de perfusion. Les molécules sont alors échangées par simple diffusion dans les deux directions selon les propriétés de la membrane et le gradient de concentration<sup>289</sup>. Cependant pour les molécules très hydrophobes comme le PTX, l'utilisation de la microdialyse est complexe car le PTX a tendance à s'adsorber sur la membrane de la sonde comme sur les tissus biologiques. Enfin, le marquage du PTX sur des coupes histologiques de tumeur au cours du traitement, apporteraient des informations relatives à la distribution intra ou péri tumorales des principes actifs. Pour ce faire, des anticorps spécifiques de nos molécules d'intérêt sont nécessaires. Des dosages ELISA du PTX, du SU et du FTY existent déjà, il serait donc envisageable de mettre au point ces marquages sur des coupes histologiques.

### **Combinaisons de molécules hydrophobes**

Le PTX et le SU sont deux molécules hydrophobes qui présentent les caractéristiques adéquates à l'incorporation dans le MedinGel™. Ces molécules de part leurs caractéristiques physico-chimiques se trouvent piégées dans les parties hydrophobes de l'hydrogel constituées de PLA. La combinaison de molécules de chimiothérapies incorporées dans un système de relargage local, a encore été peu étudiée<sup>265</sup>. C'est pourquoi, nous avons commencé à envisager d'autres molécules anticancéreuses à délivrer par l'hydrogel associées ou non au PTX. L'efficacité de l'association du SU et du FTY (Projet n°7) a été évaluée dans l'idée de réaliser une trithérapie avec le PTX. Les différentes combinaisons de ces 3 molécules ont à chaque fois présentées un bénéfice sur la monothérapie. Nos résultats confirment à la fois le choix des molécules ainsi que la stratégie combinatoire utilisée. En

effet, différents travaux, ont déjà montrés l'intérêt des combinaisons cytotoxique/anti-angiogénique<sup>90,235</sup>, particulièrement pour le PTX<sup>17</sup>. Ainsi, évaluer l'efficacité de cette trithérapie de manière locale serait une prochaine étape.

De même, un grand nombre de molécules anticancéreuses voient leur phase de développement stoppé de part leur trop grande toxicité (Semaxanib, Cf. Partie bibliographique) ou de part leur problèmes galéniques, pourraient bénéficier d'une formulation par hydrogel. En effet, le relargage local pourrait limiter leur toxicité systémique. Nous donnons ici un exemple de ces molécules qui pourraient être formulées avec les hydrogels (Table 20).

Principe actif (DCI)	Nom commercial	Mode d'administration classique	Log P	Principal inconvénient de la formulation systémique
<b>Antimétabolites</b>				
5 Fluoro-uracile	Fluoro-uracile	I.V.	-0.6	Neutropénie
<b>Taxanes</b>				
Paclitaxel	Taxol	I.V.	4.9	Formulation avec le CrEI
Eribulin mesylate	Halaven	I.V.	1.9	
<b>Intercalants</b>				
Doxorubicine	Adriblastine	I.V.	0.6	Carditoxicité
Chloroquine	-	I.V.	5	Toxicité Gastrointestinale
<b>Alkylants</b>				
Cyclophosphamide	Endoxan	I.V.	0.7	Hématurie
Laromustine	Chloretazine	I.V.	-0.6	Complications hématologiques et pulmonaires
<b>Inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine Kinase</b>				
Sunitinib malate	Sutent	P.O.	1.9	Neutropénie
Semaxanib	-	-	2.8	Forte toxicité générale
Gefitinib	Iressa	P.O.	4.1	Anorexie
Lapatinib	Tyverb	P.O.	6.1	Problèmes cardiaque
<b>Anticorps monoclonaux</b>				
Trastuzumab	Herceptin	I.V.		Réactions allergiques
Pertuzumab	Avastin	I.V.		Toxicité hépatique
Bevacuzimab		I.V.		Hémorragies (rare)
<b>Inhibiteur de mTOR</b>				
Everolimus	Afinitor		4.8	Effet immunosuppresseur
Temsirolimus	Torisel	I.V.	4.7	Insuffisance hépatique
<b>Hormonothérapie</b>				
Tamoxifène	Nolvadex	P.O.	6.0	Favorise les thrombus sanguins
Anastrozole	Arimidex	P.O.	2.8	Réactions allergiques
<b>Inhibiteurs d'histones déacétylases</b>				
Acide suberoylanilide hydroxamique	Vorinostat	P.O.	2.5	Lymphopénie
<b>Autres</b>				
Carmustine	Gliadel	I.V. ou local	1.6	Forte toxicité générale
Fingolimod	Gilenya	P.O.	4.7	Effet immunosuppresseur

**Table 20 : Principes actifs avec un intérêt en relargage local.** IV: intraveineux, P.O: per os.

### Combinaisons de molécules ayant des Log P très différents

Les molécules hydrophobes sont les plus facilement formulables dans l'hydrogel. Cependant, il serait aussi envisageable de combiner une molécule hydrophobe et une molécule hydrophile, chacune pourrait alors se répartir dans la zone de l'hydrogel qui lui correspond. La molécule hydrophile se retrouverait piégée dans la partie composée de PEG et la molécule hydrophobe dans celle composée de PLA. Ainsi 100 % de l'hydrogel serait utilisé.

### **Application à d'autres types de cancers**

Pour le cancer du sein, comme pour la plupart des cancers solides, l'exérèse chirurgicale reste le traitement de première intention. Cette dernière peut être partielle (tumorectomie) ou totale (mastectomie). Malgré l'ablation totale du sein, on dénombre un taux de rechute locale compris entre 10 et 15% à 20 ans<sup>189</sup>. Une thérapie locale post-exérèse permettrait sans doute de réduire ce taux de récurrence locale. De la même manière, traiter de manière préventive avec une injection de MedinGel™ combinée à des chimiothérapies autour des ganglions proches de la tumeur permettrait de réduire le taux de récurrence. En effet, les ganglions sont des sites d'extensions préférentiels de la tumeur et ne sont pas toujours détectés au moment de l'acte chirurgical (plus de 40 % des patientes classées cliniquement NO sont en réalité N+ histologiquement) et sont, la encore, responsables de rechute quelques années plus tard.

D'autres cancers locaux pourraient aussi bénéficier de la libération locale des chimiothérapies. En particulier, les gliomes pour lesquels il existe peu de traitements efficaces. La barrière hémato-méningée est un frein pour le passage des thérapies systémiques, le relargage local y trouve tout son intérêt. Des stratégies ont déjà été évaluées en ce sens. Le Gliadel® est un petit implant de carmustine (qui est une chimiothérapie utilisée en intraveineuse pour le traitement des glioblastomes) couplé à un polymère, le polifeprosan 20, qui a obtenu son AMM en 2003. Les implants de Gliadel® sont placés au moment de l'intervention chirurgicale mais ils se dégradent en quelques heures. Un système de relargage plus prolongé que l'on pourrait répéter sans être obligé de recourir à un acte chirurgical serait une avancée.

Les sarcomes seraient eux aussi de bons candidats pour les thérapies à relargage local. En effet, les sarcomes (ostéosarcomes, rhabdomyosarcomes, leiomyosarcomes, chondrosarcomes,...) sont des cancers très invasifs dont l'exérèse est souvent compliquée et incomplète car les limites de ces tumeurs sont difficiles à identifier en per-opératoire. Une exérèse aussi complète que possible suivie d'une chimiothérapie à relargage local serait une amélioration pour les patients atteints de ce type de pathologie. De plus, un modèle d'ostéosarcome greffable a été développé au sein du laboratoire, nous serions donc à même de réaliser ces expériences.

### **Utilisation en Médecine Vétérinaire**

Avec l'évolution des modes de vie, la population attache de plus en plus d'importance à ses animaux de compagnie et souhaite qu'ils puissent bénéficier de traitements contre le cancer. Les tumeurs animales sont très répandues et les tumeurs mammaires représentent le cancer le plus fréquent chez la chienne. Cette application vétérinaire sur un marché en forte croissance<sup>125</sup>, représente donc une potentielle valorisation de notre système. De plus, les cancers développés par nos animaux de compagnie sont proches de ceux développés par l'espèce humaine<sup>121</sup> en comparaison de nos modèles animaux développés chez la souris ou le rat. En effet, nos animaux de compagnie évoluent dans le même environnement que nous, et comme pour l'espèce humaine, leurs tumeurs se développent de manière spontanée suite à l'exposition aux carcinogènes<sup>121-123</sup>, contrairement aux animaux de laboratoire. L'application vétérinaire de nos résultats constituerait certainement une riche source d'informations dans le cadre de la recherche translationnelle qui pourrait être appliquée à la clinique humaine. Le passage du MedinGel™ à la médecine vétérinaire pourrait apporter à l'animal traité un allongement de sa durée de vie et ceci avec une unique injection, pour une efficacité de plusieurs semaines. Ce mode d'administration n'impliquant qu'un nombre limité d'actes spécialisés ainsi que l'administration possible de plusieurs traitements simultanément, les coûts pourraient être considérablement réduits.

### **Utilisation en Médecine Humaine**

En clinique humaine, une seule injection rapide d'un hydrogel chargé de chimiothérapies et s'hydrolysant sur plusieurs semaines permettrait de pallier aux séances de perfusions lors de l'administration systémique des chimiothérapies qui sont la plupart du temps longues. De plus, si les effets secondaires pouvaient être réduits par rapport à une administration prolongée, cela augmenterait l'attractivité de ce type de formulation. Dans le cadre d'une utilisation en médecine humaine, notre hydrogel-PTX-SU serait particulièrement utile après la résection chirurgicale de la tumeur pour éradiquer les cellules tumorales restant sur les berges chirurgicales. En revanche, le traitement local ne permet pas de traiter les possibles métastases à distance, c'est pourquoi associer l'hydrogel à une chimiothérapie métronomique nous semblerait très intéressant. La chimiothérapie dite « métronomique » est un traitement de chimiothérapie à doses réduites répétées, administré de manière

quotidienne, à visée anti-tumorale<sup>290,291</sup>. Des doses plus faibles, sur une base plus régulière, peuvent également permettre une stabilisation, voire une réduction de la tumeur<sup>29,290,291</sup>. Néanmoins, lors du traitement par hydrogel, la forte toxicité locale des produits de chimiothérapies relargués obligera à s'assurer que le burst initial soit strictement limité à la quantité voulue de chimiothérapie.

## CONCLUSION

---

Dans ce travail de thèse, nous avons été amenés à formuler le Paclitaxel dans un hydrogel combiné à du Sunitib malate (Sutent®). Nous avons testé plusieurs polymères issus de la collaboration avec la société MedinCell et nous avons retenu celui dont la cinétique de relargage correspondait le plus à nos attentes (P6R1). Cette formulation galénique PTX-SU-Polymère stable et injectable par une aiguille de diamètre peu important.

Par rapport aux objectifs que nous nous étions fixés, nous avons pu montrer que cette formulation permettait une libération sur 5 jours *in vivo*. Nous avons aussi vérifié que cette formulation était d'une efficacité supérieure aux modes d'administration habituels, pour traiter des animaux ayant développé des tumeurs très agressives. Cependant, nous avons noté que cette formulation présentait une certaine toxicité, liée en partie à la chimiothérapie mais aussi au polymère lui-même.

Il conviendrait de poursuivre le travail en utilisant d'autres modèles animaux sur d'autres espèces plus proches de l'homme et/ou sur des modèles moins agressifs, et en testant des polymères qui permettent des relargages plus prolongés dans le temps. Une fois ces optimisations faites, une utilisation en clinique vétérinaire et ultérieurement en clinique humaine nous semblerait envisageable.

# REFERENCES

## BIBLIOGRAPHIQUES

1. PIC E. Localisation des ganglions sentinelles au moyen de quantum dots : Application au cancer du sein. Nancy: UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I; 2009.
2. Rudland PS, Fernig DG, Smith JA. Growth factors and their receptors in neoplastic mammary glands. *Biomed Pharmacother* 1995;49:389-99.
3. Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z. Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation* 2006;74:365-81.
4. Sternlicht MD. Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res* 2006;8:201.
5. Anderson TJ, Ferguson DJ, Raab GM. Cell turnover in the "resting" human breast: influence of parity, contraceptive pill, age and laterality. *Br J Cancer* 1982;46:376-82.
6. Ferguson DJ, Anderson TJ. Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the "resting" human breast. *Br J Cancer* 1981;44:177-81.
7. Brisken C. Hormonal control of alveolar development and its implications for breast carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7:39-48.
8. Nguyen B, Keane MM, Johnston PG. The biology of growth regulation in normal and malignant breast epithelium: from bench to clinic. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;20:223-36.
9. Polyak K. On the birth of breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 2001;1552:1-13.
10. Russo IH, Russo J. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1998;3:49-61.
11. <http://mammary.nih.gov>.
12. Olsson H. Tumour biology of a breast cancer at least partly reflects the biology of the tissue/epithelial cell of origin at the time of initiation - a hypothesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:345-50.
13. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010;46:765-81.
14. Guerin S, Doyon F, Hill C. [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer* 2009;96:51-7.
15. Belot A, Grosclaude P, Bossard N, et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2008;56:159-75.
16. Dewis R, Gribbin J. Breast Cancer: Diagnosis and Treatment: An Assessment of Need. In. 2011/09/09 ed; 2009.
17. <http://www.med.univ-rennes1.fr/cerf/edicerf/UG/UG32.html>. (Accessed at
18. Lamy PJ. Classification moléculaire des cancers du sein : utilité en clinique *Médecine Nucléaire* 2009.
19. Singletary SE, Allred C, Ashley P, et al. Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* 2002;20:3628-36.
20. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
21. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-74.
22. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8418-23.
23. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006;7:96.
24. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics* 2006;7:127.
25. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, et al. How to best classify breast cancer: conventional and novel classifications (review). *Int J Oncol* 2005;27:1307-13.

26. Mullan PB, Millikan RC. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:3219-32.
27. Davoli A, Hocevar BA, Brown TL. Progression and treatment of HER2-positive breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65:611-23.
28. Scaltriti M, Eichhorn PJ, Cortes J, et al. Cyclin E amplification/overexpression is a mechanism of trastuzumab resistance in HER2+ breast cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:3761-6.
29. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
30. Wang JM, Kumar S, Pye D, Haboubi N, al-Nakib L. Breast carcinoma: comparative study of tumor vasculature using two endothelial cell markers. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:386-8.
31. Nass SJ, Dickson RB. Defining a role for c-Myc in breast tumorigenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1997;44:1-22.
32. Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10914-21.
33. Khan S, Kumagai T, Vora J, et al. PTEN promoter is methylated in a proportion of invasive breast cancers. *Int J Cancer* 2004;112:407-10.
34. Tycko B. Epigenetic gene silencing in cancer. *J Clin Invest* 2000;105:401-7.
35. Agnoletto MH, Guecheva TN, Donde F, et al. Association of low repair efficiency with high hormone receptors expression and SOD activity in breast cancer patients. *Clin Biochem* 2007;40:1252-8.
36. Karihtala P, Winqvist R, Syvaaja JE, Kinnula VL, Soini Y. Increasing oxidative damage and loss of mismatch repair enzymes during breast carcinogenesis. *Eur J Cancer* 2006;42:2653-9.
37. Okochi E, Watanabe N, Sugimura T, Ushijima T. Single nucleotide instability: a wide involvement in human and rat mammary carcinogenesis? *Mutat Res* 2002;506-507:101-11.
38. Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:393-406.
39. Hynes NE, Lane HA. Myc and mammary cancer: Myc is a downstream effector of the ErbB2 receptor tyrosine kinase. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001;6:141-50.
40. Wazer DE, Band V. Molecular and anatomic considerations in the pathogenesis of breast cancer. *Radiat Oncol Investig* 1999;7:1-12.
41. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2:161-74.
42. Rose AA, Siegel PM. Breast cancer-derived factors facilitate osteolytic bone metastasis. *Bull Cancer* 2006;93:931-43.
43. McSherry EA, Donatello S, Hopkins AM, McDonnell S. Molecular basis of invasion in breast cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:3201-18.
44. Stasinopoulos I, Penet MF, Krishnamachary B, Bhujwalla ZM. Molecular and functional imaging of invasion and metastasis: windows into the metastatic cascade. *Cancer Biomark* 2010;7:173-88.
45. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* 2003;9:713-25.
46. Furuya M, Nishiyama M, Kasuya Y, Kimura S, Ishikura H. Pathophysiology of tumor neovascularization. *Vasc Health Risk Manag* 2005;1:277-90.
47. Slavc I, Ellenbogen R, Jung WH, et al. myc gene amplification and expression in primary human neuroblastoma. *Cancer Res* 1990;50:1459-63.
48. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
49. Dreys J. VEGF and angiogenesis: implications for breast cancer therapy. *European Journal of Cancer Supplements* 2008;6:7-13.
50. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64.
51. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:24-33.

52. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *FASEB J* 2002;16:1361-70.
53. Choong PF, Nadesapillai AP. Urokinase plasminogen activator system: a multifunctional role in tumor progression and metastasis. *Clin Orthop Relat Res* 2003;S46-58.
54. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005;23:1011-27.
55. Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. HIF-1 $\alpha$ -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;61:5731-5.
56. Edwards JG, Swinson DE, Jones JL, Muller S, Waller DA, O'Byrne KJ. Tumor necrosis correlates with angiogenesis and is a predictor of poor prognosis in malignant mesothelioma. *Chest* 2003;124:1916-23.
57. Vibet S. Augmentation de la sensibilité des cellules tumorales mammaires aux agents anticancéreux par les acides gras polyinsaturés n-3 : rôle du statut oxydant et de la vascularisation tumorale. Tours: Université François Rabelais; 2008.
58. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 2004;18:338-40.
59. Padhani AR, Ollivier L. The RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) criteria: implications for diagnostic radiologists. *Br J Radiol* 2001;74:983-6.
60. Hung DYM-C. Breast Cancer Chemosensitivity. Landes Bioscience ed: Springer Science; 2007.
61. Wani MC, Taylor HL. Plant antitumor agents: VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J Am Chem Soc* 1971;93:2325-7.
62. Kingston DGI, K. RE. History and chemistry. Paclitaxel in cancer treatment. 1995:1-34.
63. Seidman AD. The emerging role of paclitaxel in breast cancer therapy. *Clin Cancer Res* 1995;1:247-56.
64. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001;37:1590-8.
65. Perez EA. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2086-95.
66. David-Pfeuty T, Erickson HP, Pantaloni D. Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5372-6.
67. Alberts DS, Marth C, Alvarez RD, et al. Randomized phase 3 trial of interferon gamma-1b plus standard carboplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel alone for first-line treatment of advanced ovarian and primary peritoneal carcinomas: results from a prospectively designed analysis of progression-free survival. *Gynecol Oncol* 2008;109:174-81.
68. Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 2004;4:253-65.
69. Rowinsky EK, Cazenave LA, Donehower RC. Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent. *J Natl Cancer Inst* 1990;82:1247-59.
70. Dustin P. Microtubules. *Sci Am* 1980;243:66-76.
71. Jordan A, Hadfield JA, Lawrence NJ, McGown AT. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Medicinal research reviews* 1998;18:259-96.
72. Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 1979;277:665-7.
73. Ismael GF, Rosa DD, Mano MS, Awada A. Novel cytotoxic drugs: old challenges, new solutions. *Cancer treatment reviews* 2008;34:81-91.
74. Rowinsky EK, Calvo E. Novel agents that target tubulin and related elements. *Semin Oncol* 2006;33:421-35.

75. Burkhart CA, Berman JW, Swindell CS, Horwitz SB. Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene expression and cytotoxicity. *Cancer Res* 1994;54:5779-82.
76. Poruchynsky MS, Wang EE, Rudin CM, Blagosklonny MV, Fojo T. Bcl-xL is phosphorylated in malignant cells following microtubule disruption. *Cancer Res* 1998;58:3331-8.
77. Wang LG, Liu XM, Kreis W, Budman DR. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:355-61.
78. Dumontet C, Sikic BI. Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 1999;17:1061-70.
79. Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP. Taxol: mechanisms of action and resistance. *J Natl Cancer Inst Monogr* 1993:55-61.
80. Mekhail TM, Markman M. Paclitaxel in cancer therapy. *Expert opinion on pharmacotherapy* 2002;3:755-66.
81. Cabral FR. Isolation of Chinese hamster ovary cell mutants requiring the continuous presence of taxol for cell division. *J Cell Biol* 1983;97:22-9.
82. Dumontet C. Mechanisms of action and resistance to tubulin-binding agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2000;9:779-88.
83. Po'uha ST, Shum MS, Goebel A, Bernard O, Kavallaris M. LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 2010;29:597-607.
84. Verrills NM, Po'uha ST, Liu ML, et al. Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:1363-74.
85. Bhalla KN. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 2003;22:9075-86.
86. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer*;10:194-204.
87. Mathew AE, Mejillano MR, Nath JP, Himes RH, Stella VJ. Synthesis and evaluation of some water-soluble prodrugs and derivatives of taxol with antitumor activity. *J Med Chem* 1992;35:145-51.
88. Petrelli F, Borgonovo K, Barni S. Targeted delivery for breast cancer therapy: the history of nanoparticle-albumin-bound paclitaxel. *Expert Opin Pharmacother* 2010;11:1413-32.
89. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783-92.
90. Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2007;357:2666-76.
91. Di Cosimo S, Baselga J. Targeted therapies in breast cancer: where are we now? *Eur J Cancer* 2008;44:2781-90.
92. Jakesz R, Jonat W, Gnant M, et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005;366:455-62.
93. Schlotter CM, Vogt U, Allgayer H, Brandt B. Molecular targeted therapies for breast cancer treatment. *Breast Cancer Res* 2008;10:211.
94. Chang JC. HER2 inhibition: from discovery to clinical practice. *Clin Cancer Res* 2007;13:1-3.
95. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, et al. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist* 2003;8:307-25.
96. Cooke T. What is HER2? *Eur J Oncol Nurs* 2000;4:2-9.
97. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, Pusztai L, Ravdin PM, Hortobagyi GN. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009;14:320-68.
98. Karunagaran D, Tzahar E, Beerli RR, et al. ErbB-2 is a common auxiliary subunit of NDF and EGF receptors: implications for breast cancer. *EMBO J* 1996;15:254-64.

99. Moasser MM. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 2007;26:6469-87.
100. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-82.
101. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48.
102. Baselga J, Norton L, Albanell J, Kim YM, Mendelsohn J. Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* 1998;58:2825-31.
103. Leyland-Jones B. Trastuzumab: hopes and realities. *Lancet Oncol* 2002;3:137-44.
104. Jahanzeb M. Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008;8:324-33.
105. Fayette J, Soria JC, Armand JP. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *Eur J Cancer* 2005;41:1109-16.
106. Nussenbaum F, Herman IM. Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J Oncol* 2010;2010:132641.
107. Hotz HG, Hines OJ, Masood R, et al. VEGF antisense therapy inhibits tumor growth and improves survival in experimental pancreatic cancer. *Surgery* 2005;137:192-9.
108. Shim WS, Teh M, Mack PO, Ge R. Inhibition of angiopoietin-1 expression in tumor cells by an antisense RNA approach inhibited xenograft tumor growth in immunodeficient mice. *Int J Cancer* 2001;94:6-15.
109. Konner J, Dupont J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer* 2004;4 Suppl 2:S81-5.
110. Weng DE, Usman N. Angiozyme: a novel angiogenesis inhibitor. *Curr Oncol Rep* 2001;3:141-6.
111. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:273-86.
112. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
113. Posey JA, Ng TC, Yang B, et al. A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1323-32.
114. Shaheen RM, Davis DW, Liu W, et al. Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res* 1999;59:5412-6.
115. Goodman VL, Rock EP, Dagher R, et al. Approval summary: sunitinib for the treatment of imatinib refractory or intolerant gastrointestinal stromal tumors and advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:1367-73.
116. Mayer EL, Dhakil S, Patel T, et al. SABRE-B: an evaluation of paclitaxel and bevacizumab with or without sunitinib as first-line treatment of metastatic breast cancer. *Ann Oncol* 2010;21:2370-6.
117. Roskoski R, Jr. Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;356:323-8.
118. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov* 2007;6:734-45.
119. Ortholan C, Durivault J, Hannoun-Levi JM, et al. Bevacizumab/docetaxel association is more efficient than docetaxel alone in reducing breast and prostate cancer cell growth: a new

- paradigm for understanding the therapeutic effect of combined treatment. *Eur J Cancer* 2010;46:3022-36.
120. Cobleigh MA, Langmuir VK, Sledge GW, et al. A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 2003;30:117-24.
  121. Paoloni M, Khanna C. Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans. *Nat Rev Cancer* 2008;8:147-56.
  122. Knapp DW, Waters DJ. Naturally occurring cancer in pet dogs: important models for developing improved cancer therapy for humans. *Mol Med Today* 1997;3:8-11.
  123. Gordon I, Paoloni M, Mazcko C, Khanna C. The Comparative Oncology Trials Consortium: using spontaneously occurring cancers in dogs to inform the cancer drug development pathway. *PLoS Med* 2009;6:e1000161.
  124. Devauchelle P, Muller c. Actualités thérapeutiques en oncologie vétérinaire. In: France BAV, ed.; 2009.
  125. USA animal health Industry 2010-2011 Situation analysis. 2011.
  126. Sorenmo K, Kristiansen VM, cofone MA, Shofer FS, Breen AM, Goldschmidt M. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. *Veterinary and comparative oncology* 2009.
  127. Mollard S, Mousseau Y, Baaj Y, et al. How can grafted breast-cancer models be optimized? *Cancer Biology and therapy* 2011.
  128. Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A. Histological grading and prognosis in dogs with mammary carcinomas: application of a human grading method. *J Comp Pathol* 2005;133:246-52.
  129. Ruttemann GR WS, MacEwen EG. Tumors of the mammary Gland. *Small Animal Clinical Oncology* 3rd ed 2001:455-77.
  130. Goldschmidt M, Pena L, Rasotto R, Zappulli V. Classification and grading of canine mammary tumors. *Vet Pathol* 2011;48:117-31.
  131. Gama A, Alves A, Schmitt F. Identification of molecular phenotypes in canine mammary carcinomas with clinical implications: application of the human classification. *Virchows Arch* 2008;453:123-32.
  132. Elling H, Ungemach FR. Simultaneous occurrence of receptors for estradiol, progesterone, and dihydrotestosterone in canine mammary tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;105:231-7.
  133. Raynaud JP, Cotard M, Andre F, Mialot JP, Rolland PH, Martin PM. Spontaneous canine mammary tumour: a model for human endocrine therapy? *J Steroid Biochem* 1981;15:201-7.
  134. Jodi R. Feline mammary adenocarcinoma: tumor size as a prognostic indicator. *The Canadian veterinary journal* 2002;43:33-7.
  135. Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J Dairy Res* 2005;72 Spec No:98-106.
  136. Preziosi R, Sarli G, Benazzi C, Mandrioli L, Marcato PS. Multiparametric survival analysis of histological stage and proliferative activity in feline mammary carcinomas. *Res Vet Sci* 2002;73:53-60.
  137. Burrai GP, Mohammed SI, Miller MA, et al. Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer* 2010;10:156.
  138. Ferlini C, Gallo D, Scambia G. New taxanes in development. *Expert Opin Investig Drugs* 2008;17:335-47.
  139. Bradley MO, Swindell CS, Anthony FH, et al. Tumor targeting by conjugation of DHA to paclitaxel. *J Control Release* 2001;74:233-6.
  140. Singer JW. Paclitaxel poliglumex (XYOTAX, CT-2103): a macromolecular taxane. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2005;109:120-6.
  141. Matsumura Y. Polymeric micellar delivery systems in oncology. *Jpn J Clin Oncol* 2008;38:793-802.

142. Armstrong DK, Fleming GF, Markman M, Bailey HH. A phase I trial of intraperitoneal sustained-release paclitaxel microspheres (Paclimer) in recurrent ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 2006;103:391-6.
143. Elstad NL, Fowers KD. OncoGel (ReGel/paclitaxel)--clinical applications for a novel paclitaxel delivery system. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61:785-94.
144. Ibrahim NK, Desai N, Legha S, et al. Phase I and pharmacokinetic study of ABI-007, a Cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2002;8:1038-44.
145. Hennenfent KL, Govindan R. Novel formulations of taxanes: a review. Old wine in a new bottle? *Ann Oncol* 2006;17:735-49.
146. Nyman DW, Campbell KJ, Hersh E, et al. Phase I and pharmacokinetics trial of ABI-007, a novel nanoparticle formulation of paclitaxel in patients with advanced nonhematologic malignancies. *J Clin Oncol* 2005;23:7785-93.
147. Desai NP, Trieu V, Hwang LY, Wu R, Soon-Shiong P, Gradishar WJ. Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status. *Anticancer Drugs* 2008;19:899-909.
148. Desai N, Trieu V, Yao Z, et al. Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clin Cancer Res* 2006;12:1317-24.
149. Tirupathi C, Song W, Bergenfeldt M, Sass P, Malik AB. Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 1997;272:25968-75.
150. Thomas ES, Gomez HL, Li RK, et al. Ixabepilone plus capecitabine for metastatic breast cancer progressing after anthracycline and taxane treatment. *J Clin Oncol* 2007;25:5210-7.
151. Miele E, Spinelli GP, Tomao F, Tomao S. Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane ABI-007) in the treatment of breast cancer. *Int J Nanomedicine* 2009;4:99-105.
152. Sabbatini P, Aghajanian C, Dizon D, et al. Phase II study of CT-2103 in patients with recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004;22:4523-31.
153. Li C, Wallace S. Polymer-drug conjugates: recent development in clinical oncology. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:886-98.
154. Li C, Price JE, Milas L, et al. Antitumor activity of poly(L-glutamic acid)-paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors. *Clin Cancer Res* 1999;5:891-7.
155. Li C, Yu DF, Newman RA, et al. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. *Cancer Res* 1998;58:2404-9.
156. Boddy AV, Plummer ER, Todd R, et al. A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex (XYOTAX), investigating both 3-weekly and 2-weekly schedules. *Clin Cancer Res* 2005;11:7834-40.
157. Verschraegen CF, Skubitz K, Daud A, et al. A phase I and pharmacokinetic study of paclitaxel poliglumex and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;63:903-10.
158. Zentner GM, Rathi R, Shih C, et al. Biodegradable block copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. *J Control Release* 2001;72:203-15.
159. Bagley CA, Bookland MJ, Pindrik JA, Ozmen T, Gokaslan ZL, Witham TF. Local delivery of oncoGel delays paresis in rat metastatic spinal tumor model. *J Neurosurg Spine* 2007;7:194-8.
160. Tyler B, Fowers KD, Li KW, et al. A thermal gel depot for local delivery of paclitaxel to treat experimental brain tumors in rats. *J Neurosurg* 2010;113:210-7.
161. Langer R, Folkman J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. *Nature* 1976;263:797-800.
162. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998;392:5-10.
163. Wichterle OL, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature* 1960;185:117-8.

164. Van Vlierberghe S, Dubrue P, Schacht E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* 2011;12:1387-408.
165. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:27-46.
166. Hennink WE, van Nostrum CF. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:13-36.
167. Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:1379-408.
168. De Souza R, Zahedi P, Allen CJ, Piquette-Miller M. Polymeric drug delivery systems for localized cancer chemotherapy. *Drug Deliv* 2010;17:365-75.
169. Lee SH, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:339-59.
170. Gehrke SH, Amidon GL, Lee PI, Topp EM. Synthesis and properties of hydrogels used for drug delivery. In: Dekker M, ed. *Transport Processes in Pharmaceutical Systems*. New York; 2000:473-546.
171. Gupta AP, Kumar V. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers- Polylactide: A critique. *European Polymer Journal* 2007;43:4053-74.
172. Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins. *Biotechnol J* 2010;5:113-28.
173. Abuchowski A, McCoy JR, Palczuk NC, van Es T, Davis FF. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *J Biol Chem* 1977;252:3582-6.
174. Yamaoka T, Tabata Y, Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. *J Pharm Sci* 1994;83:601-6.
175. Vittaz M, Bazile D, Spenlehauer G, et al. Effect of PEO surface density on long-circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* 1996;17:1575-81.
176. Kunii R, Onishi H, Machida Y. Preparation and antitumor characteristics of PLA/(PEG-PPG-PEG) nanoparticles loaded with camptothecin. *Eur J Pharm Biopharm* 2007;67:9-17.
177. Beletsi A, Panagi Z, Avgoustakis K. Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers. *Int J Pharm* 2005;298:233-41.
178. Ameller T, Marsaud V, Legrand P, Gref R, Barratt G, Renoir JM. Polyester-poly(ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. *Pharm Res* 2003;20:1063-70.
179. Avgoustakis K, Beletsi A, Panagi Z, et al. Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA-mPEG nanoparticles. *Int J Pharm* 2003;259:115-27.
180. Harris JM, Chess RB. Effect of pegylation on pharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:214-21.
181. Li F, Li S, Vert M. Synthesis and rheological properties of polylactide/poly(ethylene glycol) multiblock copolymers. *Macromol Biosci* 2005;5:1125-31.
182. He G, Ma LL, Pan J, Venkatraman S. ABA and BAB type triblock copolymers of PEG and PLA: a comparative study of drug release properties and "stealth" particle characteristics. *Int J Pharm* 2007;334:48-55.
183. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994;263:1600-3.
184. MedinGel Entrapes active pharmaceutical ingredients (APIs) which are released over days, weeks, and months after a single injection 2000. (Accessed 21/10/11, 2011, at <http://www.medincell.com/medingel/technology/>)
185. Li s, Vert M. Biodegradation of aliphatic polyester. In: scott G, ed. *Degradable polymers: principles and applications*: Gerald Scott; 2002.

186. Shive MS, Anderson JM. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv Drug Deliv Rev* 1997;28:5-24.
187. Vert M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20:437-46.
188. Babensee JE, Cornelius RM, Brash JL, Sefton MV. Immunoblot analysis of proteins associated with HEMA-MMA microcapsules: human serum proteins in vitro and rat proteins following implantation. *Biomaterials* 1998;19:839-49.
189. Monteil J, Dutour A, Akla B, et al. In vivo follow-up of rat tumor models with 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose/dual-head coincidence gamma camera imaging. *Mol Imaging Biol* 2005;7:220-8.
190. Kim IS, Baek SH. Mouse models for breast cancer metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*.
191. Medina D. Chemical carcinogenesis of rat and mouse mammary glands. *Breast disease* 2007;28:63-8.
192. Wang B, Kennan WS, Yasukawa-Barnes J, Lindstrom MJ, Gould MN. Difference in the response of neu and ras oncogene-induced rat mammary carcinomas to early and late ovariectomy. *Cancer research* 1992;52:4102-5.
193. Gould MN. Rodent models for the study of etiology, prevention and treatment of breast cancer. *Semin Cancer Biol* 1995;6:147-52.
194. Smits BM, Cotroneo MS, Haag JD, Gould MN. Genetically engineered rat models for breast cancer. *Breast disease* 2007;28:53-61.
195. Zarbl H. Toxicogenomic analyses of genetic susceptibility to mammary gland carcinogenesis in rodents: implications for human breast cancer. *Breast disease* 2007;28:87-105.
196. Akla B, Monteil J, Paraf F, Sturtz F, Rigaud M. A new orthotopic model of human breast cancer in immunocompetent rats. *Anticancer Res* 2003;23:3761-6.
197. Mayer AD, Dmitrewski J, Squifflet JP, et al. Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group. *Transplantation* 1997;64:436-43.
198. Jiang H, Sakuma S, Fujii Y, et al. Tacrolimus versus cyclosporin A: a comparative study on rat renal allograft survival. *Transpl Int* 1999;12:92-9.
199. Briske-Anderson MJ, Finley JW, Newman SM. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997;214:248-57.
200. Chang-Liu CM, Woloschak GE. Effect of passage number on cellular response to DNA-damaging agents: cell survival and gene expression. *Cancer Lett* 1997;113:77-86.
201. Wenger SL, Senft JR, Sargent LM, Bamezai R, Bairwa N, Grant SG. Comparison of established cell lines at different passages by karyotype and comparative genomic hybridization. *Biosci Rep* 2004;24:631-9.
202. Degasperi GR, Zecchin KG, Borecky J, et al. Verapamil-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel regulation of Th1-type proliferation of splenic lymphocytes induced by Walker 256 tumor development in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;549:179-84.
203. Carlsson G, Gullberg B, Hafstrom L. Estimation of liver tumor volume using different formulas - an experimental study in rats. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;105:20-3.
204. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 2004;432:332-7.
205. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
206. Yue W, Wang JP, Hamilton CJ, Demers LM, Santen RJ. In situ aromatization enhances breast tumor estradiol levels and cellular proliferation. *Cancer Res* 1998;58:927-32.
207. Clevenger CV, Gadd SL, Zheng J. New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *Trends Endocrinol Metab* 2009;20:223-9.
208. Wagner KU. Models of breast cancer: quo vadis, animal modeling? *Breast Cancer Res* 2004;6:31-8.

209. Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR, et al. Image-guided tumor resection using real-time near-infrared fluorescence in a syngeneic rat model of primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:679-89.
210. Lingappa M, Song H, Thompson S, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Sgouros G. Immunoliposomal delivery of <sup>213</sup>Bi for alpha-emitter targeting of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:6815-23.
211. Mendes O, Kim HT, Lungu G, Stoica G. MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2. *Clin Exp Metastasis* 2007;24:341-51.
212. Albain KS, Nag SM, Calderillo-Ruiz G, et al. Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment. *J Clin Oncol* 2008;26:3950-7.
213. Amar S, Roy V, Perez EA. Treatment of metastatic breast cancer: looking towards the future. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:413-22.
214. Bullock K, Blackwell K. Clinical efficacy of taxane-trastuzumab combination regimens for HER-2-positive metastatic breast cancer. *Oncologist* 2008;13:515-25.
215. Cortes J, Roche H. Docetaxel combined with targeted therapies in metastatic breast cancer. *Cancer Treat Rev* 2011.
216. Herbst RS, Khuri FR. Mode of action of docetaxel - a basis for combination with novel anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 2003;29:407-15.
217. Spirig C, Thurlimann B, Huober J. [New treatment approaches in breast cancer]. *Ther Umsch* 2008;65:207-10.
218. Meijer L, Borgne A, Mulner O, et al. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 1997;243:527-36.
219. Wojciechowski J, Horky M, Gueorguieva M, Wesierska-Gadek J. Rapid onset of nucleolar disintegration preceding cell cycle arrest in roscovitine-induced apoptosis of human MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer* 2003;106:486-95.
220. Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J, Horky M. Cell cycle arrest induced in human breast cancer cells by cyclin-dependent kinase inhibitors: a comparison of the effects exerted by roscovitine and olomoucine. *Pol J Pharmacol* 2004;56:635-41.
221. Maggiorella L, Aubel C, Haton C, et al. Cooperative effect of roscovitine and irradiation targets angiogenesis and induces vascular destabilization in human breast carcinoma. *Cell Prolif* 2009;42:38-48.
222. Limami Y, Pinon A, Leger DY, et al. HT-29 colorectal cancer cells undergoing apoptosis overexpress COX-2 to delay ursolic acid-induced cell death. *Biochimie* 2011;93:749-57.
223. Harmand PO, Duval R, Delage C, Simon A. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells. *Int J Cancer* 2005;114:1-11.
224. Harmand PO, Duval R, Liagre B, et al. Ursolic acid induces apoptosis through caspase-3 activation and cell cycle arrest in HaCat cells. *Int J Oncol* 2003;23:105-12.
225. Es-Saady D, Simon A, Jayat-Vignoles C, Chulia AJ, Delage C. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer Res* 1996;16:481-6.
226. Kwon SH, Park HY, Kim JY, Jeong IY, Lee MK, Seo KI. Apoptotic action of ursolic acid isolated from Corni fructus in RC-58T/h/SA#4 primary human prostate cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:6435-8.
227. Subbaramaiah K, Michaluart P, Sporn MB, Dannenberg AJ. Ursolic acid inhibits cyclooxygenase-2 transcription in human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 2000;60:2399-404.
228. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005;97:512-23.

229. Mousseau Y, Leclers D, Faucher-Durand K, et al. Improved agarose gel assay for quantification of growth factor-induced cell motility. *Biotechniques* 2007;43:509-16.
230. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;75:817-25.
231. Das GC, Holiday D, Gallardo R, Haas C. Taxol-induced cell cycle arrest and apoptosis: dose-response relationship in lung cancer cells of different wild-type p53 status and under isogenic condition. *Cancer Lett* 2001;165:147-53.
232. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 1997;91:443-6.
233. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10964-7.
234. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
235. Ma J, Waxman DJ. Combination of antiangiogenesis with chemotherapy for more effective cancer treatment. *Molecular cancer therapeutics* 2008;7:3670-84.
236. Xin H, Zhang C, Herrmann A, Du Y, Figlin R, Yu H. Sunitinib inhibition of Stat3 induces renal cell carcinoma tumor cell apoptosis and reduces immunosuppressive cells. *Cancer Res* 2009;69:2506-13.
237. Seandel M, Shia J, Linkov I, Maki RG, Antonescu CR, Dupont J. The activity of sunitinib against gastrointestinal stromal tumor seems to be distinct from its antiangiogenic effects. *Clin Cancer Res* 2006;12:6203-4.
238. Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 2008;60:181-95.
239. Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer* 2010;10:489-503.
240. PAPAGEORGIOU GZ, BIKIARIS NZ. Crystallization and Enzymatic Hydrolysis of PLA Grade for Orthopedics. *Advances in Polymer Technology* 2010;19:280–99.
241. Schwach G, Vert M. In vitro and in vivo degradation of lactic acid-based interference screws used in cruciate ligament reconstruction. *Int J Biol Macromol* 1999;25:283-91.
242. de Tayrac R, Chentouf S, Garreau H, et al. In vitro degradation and in vivo biocompatibility of poly(lactic acid) mesh for soft tissue reinforcement in vaginal surgery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;85:529-36.
243. Therin M, Christel P, Li S, Garreau H, Vert M. In vivo degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids): validation of in vitro findings. *Biomaterials* 1992;13:594-600.
244. Spenlehauer G, Vert M, Benoit JP, Boddaert A. In vitro and in vivo degradation of poly(D,L lactide/glycolide) type microspheres made by solvent evaporation method. *Biomaterials* 1989;10 557-63.
245. Shord SS, Camp JR. Intravenous administration of paclitaxel in Sprague-Dawley rats: what is a safe dose? *Biopharm Drug Dispos* 2006;27:191-6.
246. Haznedar JO, Patyna S, Bello CL, et al. Single- and multiple-dose disposition kinetics of sunitinib malate, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor: comparative plasma kinetics in non-clinical species. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;64:691-706.
247. Soltau J, Drevs J. Mode of action and clinical impact of VEGF signaling inhibitors. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:649-62.
248. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24:16-24.
249. Rixe O, Bukowski RM, Michaelson MD, et al. Axitinib treatment in patients with cytokine-refractory metastatic renal-cell cancer: a phase II study. *Lancet Oncol* 2007;8:975-84.
250. Honeywell R, Yarzadah K, Giovannetti E, et al. Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010;878:1059-68.

251. Houk BE, Bello CL, Poland B, Rosen LS, Demetri GD, Motzer RJ. Relationship between exposure to sunitinib and efficacy and tolerability endpoints in patients with cancer: results of a pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;66:357-71.
252. Bergers G, Song S, Meyer-Morse N, Bergsland E, Hanahan D. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 2003;111:1287-95.
253. Maione P, Gridelli C, Troiani T, Ciardiello F. Combining targeted therapies and drugs with multiple targets in the treatment of NSCLC. *Oncologist* 2006;11:274-84.
254. Tanski WJ, Nicholl SM, Kim D, Fegley AJ, Roztocil E, Davies MG. Sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration involves the mammalian target of rapamycin. *J Vasc Surg* 2005;41:91-8.
255. Takuwa Y, Du W, Qi X, Okamoto Y, Takuwa N, Yoshioka K. Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World J Biol Chem* 2010;1:298-306.
256. Banerjee S, Sengupta K, Dhar K, et al. Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Mol Carcinog* 2006;45:871-80.
257. Rajkumar VS, Shiwen X, Bostrom M, et al. Platelet-derived growth factor-beta receptor activation is essential for fibroblast and pericyte recruitment during cutaneous wound healing. *Am J Pathol* 2006;169:2254-65.
258. Kaiparettu BA, Kuiatse I, Tak-Yee Chan B, Benny Kaiparettu M, Lee AV, Oesterreich S. Novel egg white-based 3-D cell culture system. *Biotechniques* 2008;45:165-8, 70-1.
259. Campbell NE, Greenaway J, Henkin J, Moorehead RA, Petrik J. The thrombospondin-1 mimetic ABT-510 increases the uptake and effectiveness of cisplatin and paclitaxel in a mouse model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 2010;12:275-83.
260. Huang G, Chen L. Recombinant human endostatin improves anti-tumor efficacy of paclitaxel by normalizing tumor vasculature in Lewis lung carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:1201-11.
261. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, et al. Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;76:1537-45.
262. Castaneda CA, Gomez HL. Targeted therapies: Combined lapatinib and paclitaxel in HER2-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6:308-9.
263. Cox MC, Dan TD, Swain SM. Emerging drugs to replace current leaders in first-line therapy for breast cancer. *Expert Opin Emerg Drugs* 2006;11:489-501.
264. Clarke R. The role of preclinical animal models in breast cancer drug development. *Breast Cancer Res* 2009;11 Suppl 3:S22.
265. Zhang H, Wang G, Yang H. Drug delivery systems for differential release in combination therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8:171-90.
266. Azuma H, Takahara S, Horie S, Muto S, Otsuki Y, Katsuoka Y. Induction of apoptosis in human bladder cancer cells in vitro and in vivo caused by FTY720 treatment. *J Urol* 2003;169:2372-7.
267. Ho JW, Man K, Sun CK, Lee TK, Poon RT, Fan ST. Effects of a novel immunomodulating agent, FTY720, on tumor growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1430-8.
268. Salinas NR, Lopes CT, Palma PV, Oshima CT, Bueno V. Lung tumor development in the presence of sphingosine 1-phosphate agonist FTY720. *Pathol Oncol Res* 2009;15:549-54.
269. Salinas NR, Oshima CT, Cury PM, Cordeiro JA, Bueno V. FTY720 and lung tumor development. *Int Immunopharmacol* 2009;9:689-93.
270. Wolf AM, Eller K, Zeiser R, et al. The sphingosine 1-phosphate receptor agonist FTY720 potentially inhibits regulatory T cell proliferation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2009;183:3751-60.

271. Su WC, Lai WW, Chen HH, et al. Combined intrapleural and intravenous chemotherapy, and pulmonary irradiation, for treatment of patients with lung cancer presenting with malignant pleural effusion. A pilot study. *Oncology* 2003;64:18-24.
272. Weinberg BD, Ai H, Blanco E, Anderson JM, Gao J. Antitumor efficacy and local distribution of doxorubicin via intratumoral delivery from polymer millirods. *J Biomed Mater Res A* 2007;81:161-70.
273. Davis JL, Pandalai P, Ripley RT, et al. Regional chemotherapy in locally advanced pancreatic cancer: RECLAP trial. *Trials* 2011;12:129.
274. Bibby MC. Orthotopic models of cancer for preclinical drug evaluation: advantages and disadvantages. *Eur J Cancer* 2004;40:852-7.
275. Clarke R. Animal models of breast cancer: their diversity and role in biomedical research. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:1-6.
276. Hollingshead MG. Antitumor efficacy testing in rodents. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:1500-10.
277. Russo J, Russo IH. Experimentally induced mammary tumors in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:7-20.
278. Kinders R, Parchment RE, Ji J, et al. Phase 0 clinical trials in cancer drug development: from FDA guidance to clinical practice. *Mol Interv* 2007;7:325-34.
279. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:711-5.
280. Mollard S, Mousseau Y, Baaj Y, et al. How can grafted breast cancer models be optimized? *Cancer Biol Ther* 2011;12.
281. Eil C, Douglass EC, Rosenburg SM, Kano-Sueoka T. Receptor characteristics of the rat mammary carcinoma cell line 64-24. *Cancer research* 1981;41:42-8.
282. Chow LW, Cheung MN, Loo WT, Guan XY. A rat cell line derived from DMBA-induced mammary carcinoma. *Life sciences* 2003;73:27-40.
283. Nakanishi H, Taylor RM, Chrest FJ, et al. Progression of hormone-dependent adenocarcinoma cells to hormone-independent spindle carcinoma cells in vitro in a clonal spontaneous rat mammary tumor cell line. *Cancer research* 1995;55:399-407.
284. Bibby MC. Making the most of rodent tumour systems in cancer drug discovery. *British Journal of Cancer* 1999;79:1633-40.
285. Thompson HJ, Adlakha H. Dose-responsive induction of mammary gland carcinomas by the intraperitoneal injection of 1-methyl-1-nitrosourea. *Cancer Res* 1991;51:3411-5.
286. Borowsky A. Special considerations in mouse models of breast cancer. *Breast disease* 2007;28:29-38.
287. Fantozzi A, Christofori G. Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 2006;8:212.
288. Filipiak WE, Saunders TL. Advances in transgenic rat production. *Transgenic Res* 2006;15:673-86.
289. Geeraertsa T, Duranteaua J, Viguéa B. Brain microdialysis: Methodology and clinical applications. 2010;17:702-7
290. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000;60:1878-86.
291. Gaumier A, Hamizi S, You B, Freyer G. La chimiothérapie métronomique du cancer du sein métastatique : à propos d'un cas. *Oncologie* 2010;12 436-9.
292. Cailleau R, Young R, Olive M, Reeves WJ, Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:661-74.
293. Blouin S, Moreau MF, Basle MF, Chappard D. Relations between radiograph texture analysis and microcomputed tomography in two rat models of bone metastases. *Cells Tissues Organs* 2006;182:182-92.

294. Coudore F, Authier N, Guillaume D, Beal A, Duroux E, Fialip J. High-performance liquid chromatographic determination of paclitaxel in rat serum: application to a toxicokinetic study. *Journal of chromatography* 1999;721:317-20.
295. Bouchet S, Chauzit E, Ducint D, et al. Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS. *Clin Chim Acta* 2011;412:1060-7.

# FICHES TECHNIQUES

# Fiche Technique n°1 :

## Culture des cellules adhérentes MDA-MB-231

### Milieux et réactifs :

- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium (ref : 41966-052, Invitrogen, France)
- SVF : Sérum de veau foetal (ref : M3381E, Fisher Scientific, France)
- L-glutamine (ref : 25030-024, Invitrogen, France)
- Trypsine 0.5% EDTA (ref : 25300-054, Invitrogen, France)
- PBS : Phosphate Buffer Saline (composé de NaCl à 1.38 M, KCl à 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 31 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 14.7 mM, pH 7.4)
- Diméthyle Sulfoxyde, DMSO (ref : D2579, Sigma-Aldrich, France)

### Cellules MDA-MB-231 :

Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 proviennent de Cell Line Service (Allemagne). Ce sont des cellules d'adénocarcinome mammaire humain non-hormonodépendant. Elles ont été isolées à partir d'effusion pleurale chez une femme caucasienne de 51 ans. Elles sont de type morphologique « epithelial-like »<sup>292</sup>. Cette lignée est capable de produire des tumeurs mammaires chez la souris nude.

### Culture des cellules MDA-MB-231 :

Le DMEM de base est supplémenté par 2 mM de L-glutamine, et 10% de SVF décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min. Ces cellules sont cultivées dans un incubateur thermostaté à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

A confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire lavé par du PBS. Les cellules sont détachées de leur support par incubation de 1 min à 37°C avec une solution de trypsine. L'action de la trypsine est inhibée par addition de milieu de culture complet, les cellules sont centrifugées (10 min, +4°C, 1200 rpm) puis remises en culture dans du milieu à la densité souhaitée. En culture de routine, les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'une

cellule de Malassez. Le pourcentage de viabilité est estimé par le test d'exclusion au bleu trypan.

En dehors des cultures, les cellules sont conservées sous forme congelée. Après trypsination et centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu DMEM supplémenté par 20% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le culot est resuspendu à raison de  $5 \cdot 10^6$  cellules/ml, et placé dans des cryotubes à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## Fiche Technique n°2 :

### Culture des cellules flottantes Walker 256

#### Milieux et réactifs :

- RPMI 1640 : Roswell Parck Memorial Institute 1640 (ref : 42402-016, Invitrogen, France)
- SVF : Sérum de veau fœtal (ref : M3381E, Fisher Scientific, France)
- L-glutamine (ref : 25030-024, Invitrogen, France)

#### Cellules Walker 256 :

Les cellules de tumeur mammaire Walker 256 proviennent de Cell Line Service (Allemagne). Elles sont issues d'une tumeur mammaire spontanée de rat. Cette lignée est capable de produire des tumeurs mammaires chez le rat immunocompétent Corli, Fischer<sup>293</sup>, Copenhague<sup>293</sup>, Sprague Dawley, Wistar<sup>202</sup>.

#### Culture des cellules Walker 256 :

Ces cellules flottantes sont cultivées dans du milieu RPMI 1640. Le milieu est supplémenté par 2 mM de L-glutamine, et 5% de SVF décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min. Ces cellules sont cultivées dans un incubateur thermostaté à 37°C, sous atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.

La concentration optimale à chaque passage pour cette lignée cellulaire est de 50 000/mL. Tous les 2 à 3 jours les cellules doivent être entretenues. Ainsi, elles sont centrifugées puis remises en culture dans du milieu à la densité souhaitée. En routine, les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'une cellule de Malassez et le pourcentage de viabilité est estimé par le test d'exclusion au bleu trypan.

En dehors des cultures, les cellules sont conservées sous forme congelée : après centrifugation, le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu RPMI supplémenté par 20% de SVF et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO). Le culot est resuspendu à raison de 5.10<sup>6</sup> cellules/mL, et placé dans des cryotubes à -80°C.

## Fiche Technique n°3 :

### Comptage cellulaire

*# A l'aide d'une cellule de Malassez :*

Matériel :

- Suspension cellulaire
- Cellule de Malassez de 1  $\mu\text{L}$
- Bleu de Trypan (ref : T8154, Sigma-Aldrich, France)
- Microscope

Méthode :

A la suspension cellulaire d'intérêt est ajouté du bleu de Trypan (0,1 %), à volume égal. Ce colorant est expulsé des cellules vivantes et permet de mettre en évidence les cellules mortes qui prendront une coloration bleutée. La suspension est insérée entre la lame de Malassez et lamelle, le tout est placé sous microscope. Le nombre de cellules comptées sur l'ensemble du quadrillage de la lame est ensuite ajusté afin de déterminer le nombre de cellules par mL en fonction de la dilution et de la capacité de la cellule de Mallassez.

*# A l'aide du Scepter Cell Counter (Millipore) :*

Matériel :

- Suspension cellulaire
- Scepter Cell Counter (Millipore, France)
- Embouts à usage unique : Scepter Sensor (Millipore, France)

Méthode :

Le compteur de cellules compte toutes les particules qui passent au travers de son détecteur et les classe en fonction de leur taille pour générer un histogramme de distribution. Les cellules de taille aberrante et les débris sont ensuite exclus de manière manuelle, ou automatique, afin de cibler uniquement la population d'intérêt.

Le ciblage de taille pour chaque type cellulaire doit être réalisé au préalable.

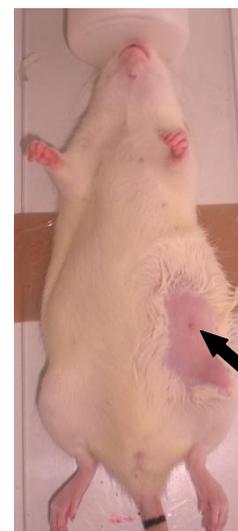


## **Fiche Technique n°4 :**

### **Induction d'une tumeur mammaire humaine orthotopique chez le rat immunocompétent**

#### **Matériel :**

- Rates femelles Sprague Dawley âgées de 3 semaines (Centre d'élevage Dépré, France)
- Agent immunosuppresseur
  - Cyclosporine A (ref : Sandimmun, Novartis, France)
  - Tacrolimus (ref : Prograf, Astellas Pharma, France)
- Système d'anesthésie gazeuse (Tem Segal, France)
- Crème dépilatoire
- Suspension cellulaire MDA-MB-231 conservée dans la glace



#### **Méthode :**

**Figure 75: Zone d'injection**

Les rates sont traitées à la Cyclosporine (30 mg/kg) ou au Tacrolimus (1, 2 ou 5 mg) en injection intra péritonéale et pesées quotidiennement. L'immunosuppression commence entre 1 et 3 jours avant la greffe selon le protocole. Les cellules viables sont trypsinées puis comptées, centrifugées et resuspendues dans un volume de 100  $\mu$ L de DMEM. Afin de pallier au volume mort de la seringue et de l'aiguille, on prévoit 500  $\mu$ L de suspension cellulaire supplémentaire.

Les rates sont anesthésiées sous 2% d'Isoflurane (AErrane, DDG9621, Baxter SA), puis épilées à la crème dépilatoire et marquées afin de pouvoir les identifier (queue et/ou oreilles). Puis on procède à l'injection de la suspension de cellules MDA-MB-231, au niveau de la glande mammaire inguinale du rat.

## **Fiche Technique n°5 :**

### **Induction d'une tumeur mammaire syngénique orthotopique chez le rat immunocompétent**

#### Matériel :

- Rates femelles Sprague Dawley âgées de 8 semaines (Centre d'élevage Dépré, France)
- Système d'anesthésie gazeuse (Tem Segal, France)
- Crème dépilatoire
- Suspension cellulaire Walker 256 conservée dans la glace

#### Méthode :

Les cellules viables sont comptées, centrifugées et resuspendues dans un volume de 100 µL de RPMI 1640. Afin de pallier au volume mort de la seringue et de l'aiguille, on prévoit 500 µL de suspension cellulaire supplémentaire.

Toutes les procédures de greffe sont réalisées sur des animaux maintenus sous anesthésie générale, par un mélange gazeux (O<sub>2</sub>/Isoflurane (1-chloro-2,2,2-trifluoroéthyl difluorométhyl éther)) dispensé au moyen d'un appareil anesthésique spécialement conçu pour les petits animaux. Le ratio de gaz administré est ajustable suivant l'âge et le poids de l'animal. La greffe tumorale est effectuée dans des conditions opératoires standards de stérilité et de sécurité.

Les rates sont épilées à l'aide de crème dépilatoire et marquées (queues et/ou oreilles). Puis on procède à l'injection de la suspension de cellules, au niveau de la glande mammaire inguinale du rat.

## Fiche Technique n°6 :

### Suivi des animaux

#### Matériel :

- Rates greffées
- Balance
- Pieds à coulisse
- Uréthane (ref : U2500-250G, Sigma-Aldrich, France)

#### Méthode :

Une observation macroscopique, une palpation et une pesée quotidienne de la rate greffée nous permettent de nous assurer de la prise de greffe et de son état de santé. Le temps de latence avant la détection par palpation varie entre 5 et 7 jours. Tout au long du traitement, la progression de la surface tumorale est appréciée par mesure de la tumeur selon deux axes perpendiculaires et le volume est calculé par l'application de la formule de Carlsson, où la tumeur est associée à une ellipsoïde (Carlsson et al., 1983) :

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

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

Le suivi de l'animal dure tout au long de l'expérimentation jusqu'à son euthanasie. Pour toute recherche sur le cancer faisant appel à des modèles animaux, des points limites doivent être déterminés dès le début de l'expérimentation. Les points limites qui ont été respectés au cours de nos expérimentations sont les suivants :

- Une perte de poids de l'animal qui ne doit pas dépasser 10% de son poids initial
- Une ulcération/infection à l'emplacement de la tumeur
- La charge tumorale qui ne doit pas excéder 10% du poids de l'animal normal ce qui correspond à un diamètre de 35 mm pour un rat de 250 g (Le Point Limite en expérimentation animale, CNRS, 2000)

A la fin de l'expérimentation les rates sont euthanasiées par une injection intra cardiaque d'uréthane à 24 % en PBS sous anesthésie gazeuse, puis les tumeurs sont disséquées, et pesées. Les tumeurs sont placées dans du formol à 10% afin de permettre une analyse histologique.

# Fiche Technique n°7 :

## Euthanasie et autopsie des animaux

Matériel (tout le matériel de chirurgie provient du fournisseur Harvard Apparatus):

- Petit ciseaux
- Grand ciseaux
- Pince coupe os
- Pince à bout droit
- Pince à bout rond
- Clamp
- Compresses tissées stériles

Méthode :

Les animaux sont euthanasiés par une injection intracardiaque d'uréthane à 24% en PBS sous anesthésie gazeuse (Isoflurane). Puis une série d'étapes est réalisée :

- Photographie de l'animal de manière latérale et ventrale avec identification et échelle centimétrique sur le champ de la photo.
- Pesée de l'animal et mesure des diamètres tumoraux
- Ablation de la tumeur
  - Pesée de la tumeur
  - Photographie de la tumeur avec échelle
  - Placement de la tumeur en formol à 10%
- Ouverture longitudinale de l'animal
  - Vérification visuelle des organes : rein, foie, système digestif, ganglions proches de la tumeur pour la recherche d'éventuelles métastases
  - Ouverture de la cage thoracique : recherche d'éventuelles métastases pulmonaires

## Fiche Technique n°8 :

### Réalisation de coupes histologiques

Il est possible de réaliser des coupes à partir de fragments congelés ou inclus en paraffine. Nous nous intéresserons plus spécifiquement à cette technique. L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières d'un prélèvement.

#### Matériel:

- Un échantillon fixé en formol 10% (Labonet, France)
- Des cassettes (Thermo Shandon, France)
- Barres de leuckart
- Solvants : Ethanol absolu, toluène, eau (VWR, France)
- Paraffine (VWR, France)
- Automate Shandon Citadel 1000 (Thermo Scientific)
- Microtome LEICA RM 2125RT

#### Technique :

- Déshydratation de l'échantillon car la paraffine n'est pas miscible dans l'eau.
  - o L'échantillon préalablement fixé est placé dans une cassette
  - o L'échantillon, est déshydraté dans un bain d'alcool
  - o Bains de toluène car la paraffine n'est pas miscible non plus à l'alcool
  - o Bains de paraffine à 56°C
- Inclusion
  - o Avec les barres, former un rectangle adapté à la taille de l'échantillon
  - o Placer un morceau de carton annoté au crayon papier (identification échantillon) sur un coté
  - o Couler la paraffine préalablement chauffée
  - o Laisser solidifier à Température ambiante au moins 1h
  - o Le bloc est prêt pour les coupes
- Réalisation de coupe au microtome

## Fiche Technique n°9 :

### Marquages des coupes histologiques

#### *# Marquage non spécifique, Coloration Hématoxyline Eosine*

Les coupes de 5 µm réalisées (Fiche Technique n°8) sont déparaffinées et traitées par deux colorants différents : l'hématoxyline (coloration des noyaux) et l'éosine (coloration du cytoplasme). A l'issue de ce type de coloration les noyaux sont bleus violets, les cytoplasmes sont roses, les hématies sont rouges clairs à jaunes et les fibres de collagène sont roses-orangées.

#### Matériel :

- |                  |                  |
|------------------|------------------|
| - Coupe de tissu | - Hématoxyline   |
| - Toluène        | - Eosine         |
| - Ethanol absolu | - Eau ammoniacée |

#### Protocole :

- Faire tremper la lame dans le toluène pour la déparaffiner (15 min)
- Rincer dans deux bains d'éthanol absolu
- Rincer à l'eau courante pendant 5 min, pour réhydrater
- Faire tremper dans une solution d'hématoxyline (10 min)
- Rincer à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau soit claire
- Effectuer quelques allers-retours dans de l'eau ammoniacée pour bleuir les noyaux.  
Attention ne pas trop laisser tremper, le risque est de décoller la coupe
- Rincer à l'eau courante (5 min)
- Faire tremper dans une solution d'éosine (10 min)
- Rincer à l'eau courante (5 min)
- Faire tremper dans deux bains d'éthanol
- Faire tremper dans du toluène
- Montage lame/lamelle

## # Marquages spécifiques : Immunomarquages :

### Matériel :

- Toluène
- Retrieval solution (ref : S1699, Dako, France)
- Peroxydase blocking solution (ref : S2023, Dako, France)
- Sérum
- Anticorps primaires
- Anticorps secondaires
- Kite avidin-biotin peroxidase (Elite Vactasain, Vector Laboratories)
- DAB peroxidase substrate kit (DAB peroxidase substrate kit, Vector Laboratories)
- Hématoxiline

### Méthodes :

- Faire tremper les lames dans du toluène (15 min)
- Rincer dans deux bains d'éthanol absolu
- Faire bouillir dans de l'eau contenant la retrieval solution (25 min)
- Laisser revenir à température ambiante
- Rincer à l'eau
- Incuber avec la solution de peroxydase (5 min)
- Rincer à l'eau puis au PBS
- Saturer à l'aide d'une solution de sérum diluée en PBS à 10% (1 h)
- Incuber avec les Anticorps primaires à 4 °C (sur la nuit)
- Incuber avec les Anticorps secondaires
- Révélation par la peroxydase et DAB
- Tremper dans l'hématoxiline (15 sec)

<b>Anticorps primaires</b>	<b>Dilution</b>
Anti $\alpha$ -actine (ref : A2547, Sigma, France)	1/1000
Anti-Caspase 3 (ab4051, AbCam, France)	1/1500
Anti-Von Villebrant factor (Ref ab6994, AbCam, France)	1/500

## **Fiche Technique n°10 :**

### **Test de prolifération cellulaire**

Dans le cadre de la recherche contre le cancer, ce test permet l'évaluation de la cytotoxicité des différentes molécules anti-cancéreuse, sur une lignée cellulaire d'intérêt.

#### Matériel :

- Suspension cellulaire
- Plaque 24 puits (Ref : 734-0993, VWR International, France)
- Milieu de culture adapté aux cellules
- Solutions de molécules cytotoxiques (Paclitaxel, Acide Ursolique, Roscovitine, Sunitinib malate, Fingolimod)
- Scepter Cell Counter (Millipore, France)

#### Méthodes :

Lors des études de prolifération, les cellules Walker 256 (Fiche Technique n°2) sontensemencées dans des plaques stériles de 24 puits, avec une densité de  $2,5 \cdot 10^4$  cellules dans un volume de 450  $\mu$ l par puits. Par la suite, 50  $\mu$ L de molécules cytotoxiques aux concentrations souhaitées, seules ou en combinaisons, sont ajoutés. Toutes les conditions sont réalisées en triplats.

- Pour la détermination des EC50, les concentrations des molécules cytotoxiques allaient de  $10^{-4}$  à  $10^{-10}$  mol/L.
- Pour l'évaluation des combinaisons les concentrations des molécules utilisées correspondaient à une dose dix fois inférieure à l'EC50

Les cellules sont laissées au contact de la ou des drogue(s) pendant 48 et 72 heures, toujours dans les mêmes conditions environnementales (atmosphère humide, 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>). Au terme de chaque durée d'exposition, les cellules de chaque puits sont récupérées, homogénéisées et placées dans un tube Epedorff de 1,5 mL afin de pouvoir être comptées au Scepter Cell Counter (Fiche Technique n°3).

# Fiche Technique n°11

## Test de migration cellulaire

### Matériel :

- Agarose de type II (ref : A6877-250G, Sigma-Aldrich, France)
- PBS : Phosphate Buffer Saline (composé de NaCl à 1.38 M, KCl à 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 31 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 14.7 mM, pH 7.4)
- RPMI 1640 : Roswell Parck Memorial Institute 1640 (Ref : 42402-016, Invitrogen, France)
- SVF : Sérum de Veau Foetal (ref : M3381E, Fisher Scientific, France)
- Forme en verre avec couloirs (Souffleur de verre, Verrerie Creusoise, France)

### Méthodes :

- **Préparation du gel**

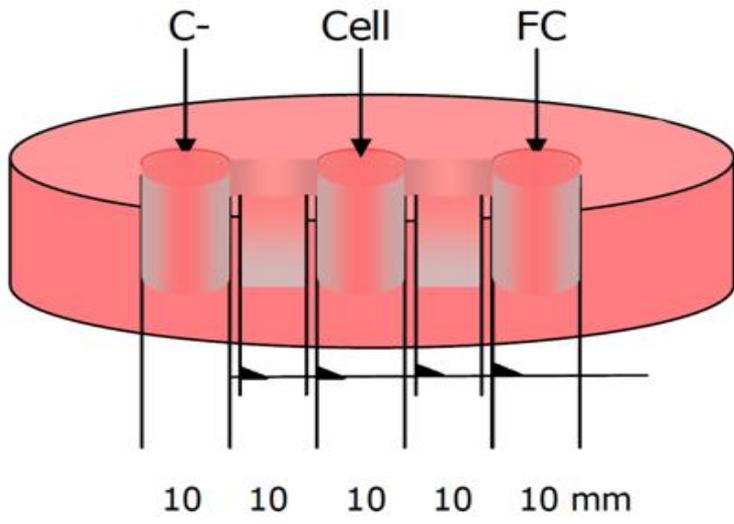
Un gel est réalisé en diluant 1% d'agarose dans un milieu composé de 50% de PBS et 50% de RPMI supplémenté avec 10% de SVF, et 2 mM de L-glutamine. Pour une boîte de Petri de 60 mm de diamètre, 10 mL de solution finale d'agarose est nécessaire. 100 mg d'agarose est ajouté à 50 ml de PBS. L'agarose est dissout dans le PBS par un passage de 3 min. au four micro-ondes. 50 ml de 10% SVF-RPMI sont ajoutés au mélange agarose/PBS. La solution ainsi produite est coulée autour des formes en verres permettant d'obtenir la forme des puits. Après 20 à 30 min. le gel est humidifié avec 5 ml de RPMI et les formes de verres sont retirées. Avant d'ensemencer les cellules, 5 ml de RPMI (sans SVF) sont déposés à la surface du gel pendant 1 à 6 heures afin de stabiliser le pH et de saturer le gel en milieu de culture pour éviter qu'il ne diffuse des puits vers le gel pendant le test de migration.

- **Ensemencement des cellules**

Les cellules sont ensemencées dans le puits central à la densité de :

- $1,5 \cdot 10^4$  cellules dans 350  $\mu$ L pour les Walker 256
- $2 \cdot 10^4$  cellules pour les CMLs

Les molécules actives sont additionnées au milieu 24 heures après l'ensemencement des cellules. Le milieu de culture est partiellement changé tous les 4 jours. Et la coloration des noyaux au Hoescht est réalisée le 8<sup>ème</sup> jour après le début du traitement



## Fiche Technique n°12 : Formulation des polymères

Les polymères sont reçus sous forme solide, ils doivent être conservés à l'abri de l'humidité, à -20°C. Ils doivent subir une étape de solubilisation avant de pouvoir être utilisés.

### Matériel:

- Polymère (P6R1, P6R2.2, P6R2.6, P6R4, MedinCell, France)
- Solvant : DMSO (ref : D1435, Sigma-Aldrich, France)
- Actif(s) :
  - o PTX : Paclitaxel (ref : P9600, LC Laboratories, USA)
  - o SU : Sunitinib malate (ref : S8803, LC Laboratories, USA)
- Incubateur rotatif à 37°C

### Méthode:

- Solubilisation des polymères :
  - o Le polymère et le solvant sont placés dans le même collecteur en verre
  - o Le tout est placé dans un incubateur rotatif à 37°C à 200 rpm sur la nuit.  
**ATTENTION : Le processus de solubilisation nécessite une incubation de 12 à 16h.** Il est important de prévoir ce processus la veille de l'expérimentation.
- Incorporation de l'actif solubilisé au préalable dans la quantité de solvant adéquate

	Polymère à 20%	Polymère à 30%	Polymère à 40%
Polymère (en mg)	40	60	80
DMSO (en µL)	150	130	110
PTX (en mg)	10	10	10

**Table 21 : Formulation des polymères pour un injectat de 200 mg**

Pour les tests *in vitro* le PTX représente 5% de la masse totale.

## Fiche Technique n°13 :

### Cinétique de relargage *in vitro* des polymères

Les cinétiques de relargages *in vitro*, nous permettent d'obtenir des informations sur la vitesse de relargage des différents actifs au sein des polymères testés.

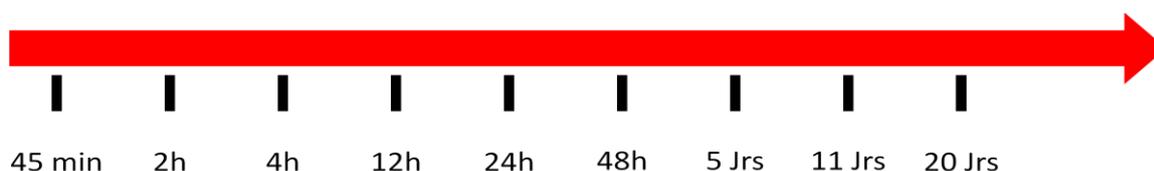
#### Matériel:

- 200 à 250 mg de polymère avec le/les principes actifs
- Milieu KRT (Pour 1L de solution : 0.73g CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O Dihydrate, 0.32g de MgSO<sub>4</sub> anhydre, 0.76mg de KCl, 6.06g de TRIS, et 16.71g de NaCl)
- Seringue de 22 Ga
- Aiguille à Insuline
- Tube flacon de 50 mL
- Tube Eppendorfs de 2 mL
- Un agitateur rotatif à 37°C

#### Méthodes :

- Pesée d'une seringue remplie avec la préparation de polymère/actif(s) (Fiche Technique n°12).
- Entre 200 et 250 mg de polymère est injecté dans un falcon contenant 25mL de KRT. L'injectat doit avoir une forme sphérique et homogène. L'hydrogel se forme lorsque l'échange de phase a lieu entre l'eau et le solvant du polymère. Lors de cet échange de phase, il y a une diffusion du solvant dans le milieu extérieur entraînant les molécules actives dans le KRT.
- La seringue est pesée à nouveau pour connaître avec précision la quantité injectée.
- Le tube Falcon est placé à 37°C, sous agitation constante (200 rpm).
- Aux temps prédéfinis (Cf cinétique de prélèvement), tout le milieu de relargage KRT a été prélevé puis intégralement remplacé.
- Les prélèvements sont aliquotes puis congelés

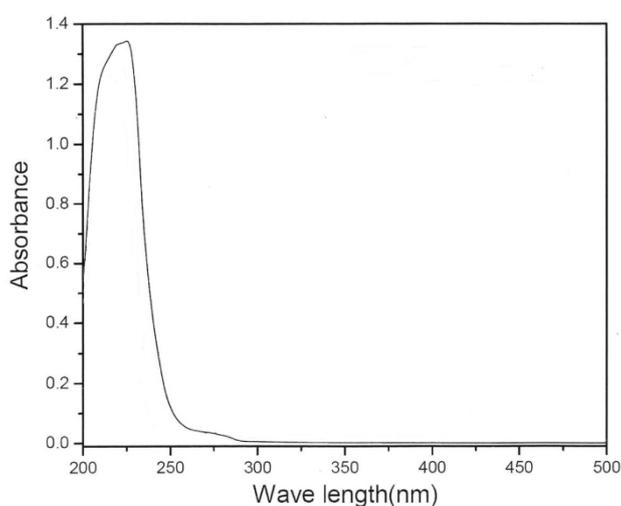
#### **Cinétique de prélèvements :**



## Fiche Technique n°14 :

### Dosage du Paclitaxel par HPLC-UV

Pour le dosage du PTX dans des échantillons humains et animaux, la méthode HPLC-UV (High Performance Liquid Chromatography) est très utilisée<sup>294</sup> depuis 1987. Cette méthode est sensible, simple et peu coûteuse. La détection de la molécule est possible en UV : son pic d'absorption se situe à 230 nm.



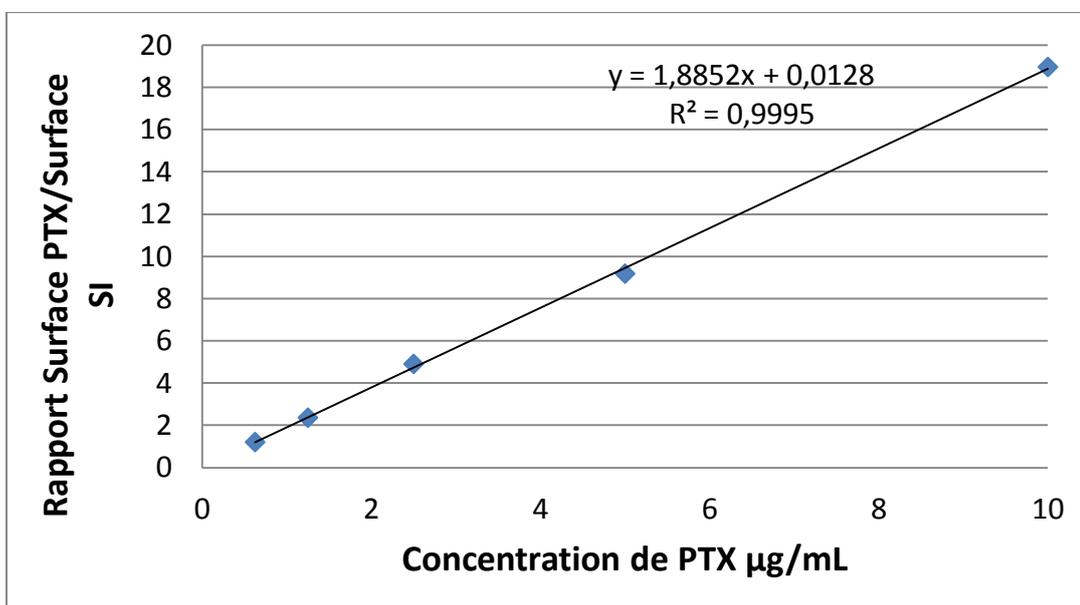
**Figure 76 : Spectre d'absorption UV du Paclitaxel. Le maximum d'absorption est retrouvé à 230nm.**

#### Matériel et réactifs :

- Précolonne (Metaguard 4.6 mm Polaris 5µm C18-A, Agilent Technologie, France)
- Colonne nucléosil C18 (Omnispher 5C18 5 µm 150 x 4.6 mm, Agilent Technologie, France)
- Standard interne (SI) : Glafénine (ref : G6895, Sigma-Aldrich, France)
- Acétonitrile HPLC grade (ref : W01920, Fisher Scientific, France)
- Eau HPLC (ref : 34877, Sigma-Aldrich, France)
- PTX : Paclitaxel (ref : P9600, LC laboratories, USA)

Technique :

- Préparation d'une gamme de PTX en concentration connue. Avant la première session de dosage, une courbe d'étalonnage est réalisée, pour les sessions ultérieures si les valeurs hautes et basses de la gamme corrént avec les premières, il n'est pas nécessaire de la refaire.



**Figure 77 : Courbe d'étalonnage du Paclitaxel pour son dosage en HPLC-UV.**

- Préparation d'une solution de SI à 5 µg/mL
- Réalisation d'une phase mobile constituée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau (55/45 v/v). Le débit utilisé est de 1 mL/min
- Préparation des échantillons : à chaque échantillon est ajouté une dose constante et connue de SI
- Passage des échantillons : les résultats bruts déterminent les surfaces représentées par la courbe de détection du PTX et de son standard interne. Ces valeurs sont reportées sur la courbe d'étalonnage afin d'obtenir la concentration en PTX de l'échantillon.

## Fiche Technique n°15 :

### Dosage du Sutent® par HPLC/MS-MS

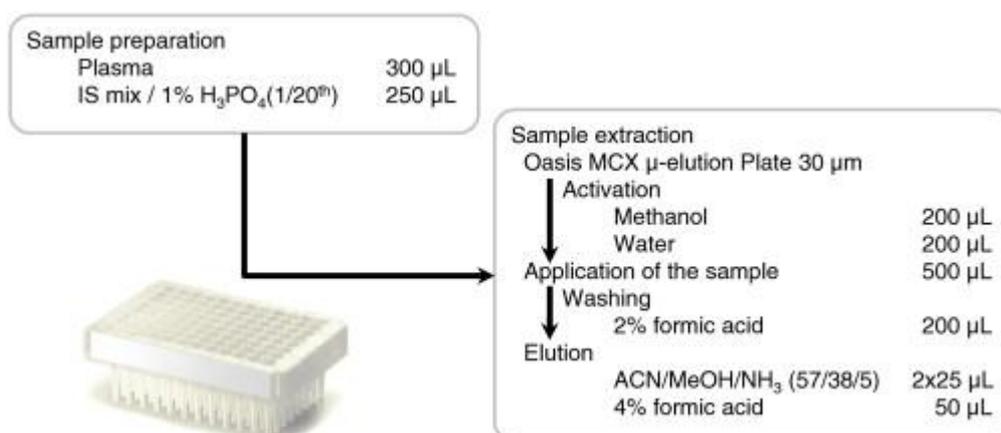
Ce dosage a été réalisé selon le protocole du Dr Bouchet du CHU de Bordeaux : « Simultaneous determination of nine tyrosine kinase inhibitors by 96-well solid-phase extraction and ultra performance LC/MS-MS »<sup>295</sup>.

#### Matériel :

- Colonne Acquity UPLC® BEH C18 50\*2.1 mm; 1.7 µm (Waters, Milford, USA)
- Plaque de micro-elution Oasis MCX 30 µm, (Waters, Milford, USA)
- Methanol HPLC Grade (Prolabo, France)
- Acide Formique (Prolabo, France)
- Eau HPLC grade (Prolabo, France)
- Formate d'ammonium formate (Prolabo, France)
- Acetonitrile HPLC grade (Prolabo, France)

#### Méthode :

- Préparation des échantillons : les échantillons de sérum sont préparés et extraits selon la procédure suivante : aux 300 µL de plasma sont additionnés 250 µL de standard interne (IS). Ce mélange est placé dans une plaque de micro-élution qui a été conditionnée au préalable par 200 µL de méthanol d'eau, puis l'ajout du mélange d'acétonitrile, méthanol et ammoniac suivi d'une solution à 4% d'acide formique permet l'élution du SU.



- Puis 5  $\mu\text{L}$  de l'éluat sont prélevés et injectés directement dans le système d'HPLC/MS-MS

La phase mobile est une combinaison de la phase A (4 mM ammonium formate, pH3.2), et de la phase B (90% acetonitrile/10% phase A). La chromatographie a été initiée avec 5% de la phase B pendant 0.15 min, puis 35% pendant 0.65 min, enfin 90% pendant 1.9 min, et ensuite retour à 5% pendant 0.12 min. Le système est rééquilibré pendant 1 min entre chaque injection. Au total un « run » de chromatographie dure 4 min avec un débit de 0.40 mL/min.

## **Fiche Technique n°16 :**

### **Prélèvements sanguins par ponction cardiaque**

Par cette technique, il est possible de recueillir 2 à 5 ml de sang sur de jeunes adultes, en vingt secondes à une minute.

#### Matériel:

- Rat Sprague Dawley (Centre d'élevage Dépré, France)
- Aiguille + Seringue 21 Ga (ref : 304622, BD bioscience, France)
- Système d'anesthésie gazeuse (Tem Segal, France)
- Uréthane (ref : U2500-250G, Sigma-Aldrich, France)
- Tubes sec de micro-prélèvement sans gel séparateur (ref : 365950, BD bioscience, France)

#### Méthode :

Le prélèvement sanguin par ponction cardiaque est une méthode qui ne doit être utilisée qu'en point final. Cette méthode permet de récolter de gros volume sanguin.

- L'animal est placé en décubitus dorsal
- Palpation du côté gauche entre la 4<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> cote, c'est la zone où les battements cardiaques sont les plus perceptibles à la palpation
- Introduction d'une aiguille montée sur une seringue, là où les battements sont les plus intenses, selon un angle de 45° avec l'axe horizontal de l'animal
- L'extrémité de l'aiguille transmet les battements cardiaques et il faut alors exercer une légère pression supplémentaire afin de pénétrer dans le ventricule gauche.
  - o Si la ponction est bonne, le sang doit affluer en jets dans la seringue.
  - o Si le flux sanguin n'est pas très puissant ou s'il n'y a que très peu de sang, c'est que l'on a perforé soit le ventricule droit soit le myocarde soit l'atrium gauche, ou que l'on a complètement traversé le cœur. Il faut alors retirer doucement l'aiguille et la repositionner pour ponctionner le ventricule gauche.

## **Fiche Technique n°17 :**

### **Imagerie médicale : Tomoscintigraphie au <sup>18</sup>FDG**

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

#### **Matériel :**

- Rats à jeun depuis 6 à 8h.
- <sup>18</sup>FDG (Flucis – Cis bio international, Gif sur Yvette, France)

#### **Méthode :**

Le rat, laissé à jeun 6 à 8 h avant l'expérience, est anesthésié par un mélange O<sub>2</sub>/Isoflurane à 3% et reçoit une injection intraveineuse (au niveau de la veine caudale) de 18,5 à 74 MBq (0,5 à 2 mCi) de <sup>18</sup>FDG. La quantification tumorale de la fixation de <sup>18</sup>FDG est définie comme étant la radioactivité détectée dans une région d'intérêt dessinée sur la tumeur sur une coupe frontale de 50 mm d'épaisseur (incluant la totalité de l'animal). La fixation tumorale est représentée par le rapport de la radioactivité mesurée dans la région d'intérêt (ROI) au niveau de la tumeur rapportée à la radioactivité totale (de tout le corps) mesurée sur la coupe. La fixation tumorale est exprimée en pourcentage de la fixation totale.

% de fixation tumorale de <sup>18</sup>FDG = radioactivité tumorale / radioactivité totale.

## Fiche Technique n°18 :

### Test de toxicité cutanée du MedinGel™

#### Matériel :

- MedinGel™ (P6R1, MedinCell, France)
- PTX : Paclitaxel (ref : P9600, LC laboratories, USA)
- SU : Sunitinib malate (ref : S8803, LC laboratories, USA)
- Seringue B BRAUN (ref : 9166017V, Roth Sochiel, France)
- Aiguilles 23G (ref : 300800, BD Microlance, France)
- Rates Sprague Dalwey de 8 semaines (Centre d'élevage Dépré, France)

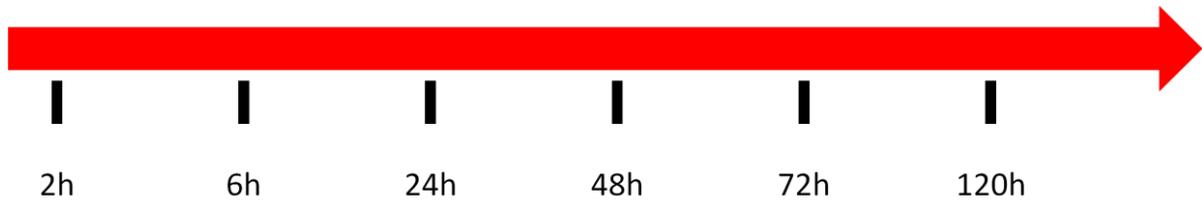
#### Déroulement de l'expérience :

**La veille de l'injection**, les animaux (rates femelles Sprague Dawley âgées de 8 semaines) sont épilées à la crème dépilatoire au niveau des sites d'injection sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2%).

**Le jour de l'injection**, les animaux sont examinés attentivement afin de s'assurer que l'épilation de la veille n'a pas endommagé l'épiderme, puis anesthésiés. Comme pour les expérimentations *in vitro*, la seringue contenant le mélange polymère/actif(s) est pesée avant et après l'injection. Chaque animal est soumis à une injection de chaque côté de son abdomen.

**Au réveil**, les animaux sont observés attentivement afin de s'assurer que le polymère ne crée pas de gêne particulière.

### Temps de prélèvements :



**Aux différents temps de prélèvements**, les animaux sont anesthésiés, puis un prélèvement de sang intracardiaque (Fiche Technique n°16) est réalisé avant leur euthanasie à l'urétrane (24% en PBS). Le sang est recueilli dans un tube sec de micro-prélèvement sans gel séparateur. Les échantillons sanguins sont laissés à température ambiante pendant 15 min puis centrifugés à 9000 rpm pendant 15 min. Le sérum est récupéré et congelé à -20°C dans l'attente des dosages sanguins.

La première zone d'injection est disséquée et photographiée, afin d'évaluer l'impact macroscopique du polymère seul ou combiné à l'actif sur les tissus sains. La seconde zone d'injection est soigneusement prélevée et sera utilisée pour l'étude anatomopathologique. Pour le déroulement de la partie anatomopathologique cf. Fiches Techniques n°7 et 8.

## **Fiche Technique n°19 :**

### **Le blanc d'œuf comme matrice de culture en 3D**

#### Matériel :

- Blanc d'œuf
- Four à 60°C
- Plaque 24 puits Nunclon (ref : 734-0992, VWR international, France)

#### Préparation du blanc :

Dans un premier temps, les coquilles des œufs sont nettoyées avec de l'alcool à 70°C. A l'aide d'une pince stérile un trou d'environ 0.5 cm est réalisé, du côté opposé un deuxième trou est effectué afin de faire un appel d'air pour faciliter la sortie du blanc. Les blancs sont séparés des jaunes de manière stérile. Pour chaque série, 24 blancs d'œufs sont poolés puis aliquoté. Chaque aliquot contient 8mL de blanc et sera congelé à -80°C en vue d'une utilisation ultérieure.

#### Préparation de la plaque et ensemencement :

Les puits d'une plaque 24 puits sont remplis avec 300 µL de blanc par puits. La plaque est ensuite placée sur un agitateur rotatif afin d'homogénéiser la distribution dans chaque puits, puis chauffée pendant 30 minutes environ dans un four à hybrider jusqu'à l'obtention d'une texture semi-solide. Les cellules peuvent alors être ensemencées dans 500 µL de leur milieu de culture respectif habituel (DMEM ou RPMI supplémentés de 10% de sérum).

# Fiche Technique n°20 :

## Culture de cellules primaires vasculaires

### Milieux et réactifs:

- RPMI 1640 : Roswell Parck Memorial Institute 1640 (ref : 42402-016, Invitrogen, France)
- SVF : Sérum de Veau Foetal (ref : M3381E, Fisher Scientific, France)
- L-glutamine (ref : 25030-024, Invitrogen, France)
- PBS : Phosphate Buffer Saline (composé de NaCl à 1.38 M, KCl à 27 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> à 31 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 14.7 mM, pH 7.4)
- Trypsine-EDTA 0.05% (ref : 25300-054, Invitrogen, France)
- DMSO : Diméthyle Sulfoxyde (ref : D2579, Sigma-Aldrich, France)

### Les cellules vasculaires :

Les cellules vasculaires sont un mélange de cellules endothéliales, musculaires et de fibroblastes. Nous les avons extraites à partir de l'aorte abdominale de rats Sprague-Dawley âgés de 6 à 8 semaines. Les cellules sont obtenues après une digestion de l'intima et de la média de l'aorte par la collagénase II.

### Culture des cellules primaires vasculaires :

Les CMLs sont des cellules adhérentes, différenciées, de morphologie fibroblastique. La croissance de ces cellules à partir des explants s'effectue par mise en culture à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu RPMI 1640 supplémenté par 2 mM de L-glutamine et 20% de SVF décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min. Ces conditions de culture sont maintenues jusqu'à obtention d'une population stable, homogène et suffisante pour la culture en routine.

A confluence, le milieu est éliminé et le tapis cellulaire est lavé par du PBS stérile. Les cellules sont détachées de leur support par incubation de 1 min. à 37°C avec une solution de trypsine-EDTA 0.05%. L'action de la trypsine est inhibée par addition de milieu de culture complet. Les cellules sont centrifugées (2000 rpm, 5 min., +4°C) puis remises en culture à la

densité voulue. Les numérations cellulaires sont effectuées à l'aide d'une cellule de Malassez. Le pourcentage de viabilité est estimé par le test d'exclusion au bleu Trypan. En routine, elles sont cultivées dans du RPMI supplémenté par 10% de SVF, dans les mêmes conditions d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours.

**PUBLICATIONS  
ACCEPTÉES OU  
SOUMISES**

**Publication n°1 : How can grafted breast cancer models be optimized?**

Acceptée dans le journal Cancer Biology & Therapy 12:10, 1–10; November 15, 2011

Auteurs : **Séverine Mollard**, Yoanne Mousseau, Yasser Baaj, Laurence Richard, Jeanne Cook-Moreau, Jacques Monteil, Benoît Funalot and Franck G. Sturtz

Article de revue abordant le problème des modèles animaux de cancers du sein et leur corrélation avec la pathologie humaine.

**Publication n°2 : Fingolimod potentiates the effects of sunitinib malate in a rat breast cancer model.**

Acceptée dans Breast Cancer Research and Treatment DOI 10.1007/s10549-011-1903-6

Auteurs: Yoanne Mousseau, **Séverine Mollard**, Karine Faucher-Durand, Laurence Richard, Angélique Nizou, Jeanne Cook-Moreau, Yasser Baaj, Hao Qiu, Xavier Plainard, Laurent Fourcade, Benoit Funalot, Franck G. Sturtz.

Article de résultats correspondant au Projet n°7 de ce manuscrit

**Publication n°3 : Local codelivery of paclitaxel and sunitinib malate by an injectable hydrogel**

En cours de finalisation

Auteurs: Séverine Mollard, Yoanne Mousseau, Laurence Richard, Yasser Baaj, Adama Ourdraogo, Serge Battu, Angélique Nizou, Jeanne Cook-Moreau, Anh Nguyen, Bernard Royer, Franck G. Sturtz.

Publication reprenant l'ensemble de ces résultats de thèse sur le relavage local de la combinaison du paclitaxel et du sunitinib.